

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 508 340**

51 Int. Cl.:

C07D 403/06 (2006.01)

C09B 23/00 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2010 E 10769743 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2426123**

54 Título: **Colorante de cianina a base de pirazol que contiene catión de amonio cuaternario**

30 Prioridad:

28.04.2009 JP 2009109634

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.10.2014

73 Titular/es:

WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

(100.0%)

**1-2, Doshomachi 3-chome Chuo-ku Osaka-shi
Osaka 540-8605, JP**

72 Inventor/es:

YAMAMOTO, NAOYUKI;

KUROSAWA, TATSUO;

HASABA, SATOSHI y

DATE, MUTSUHIRO

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 508 340 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

COLORANTE DE CIANINA A BASE DE PIRAZOL QUE CONTIENE CATION DE AMONIO CUATERNARIO**DESCRIPCIÓN****5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un colorante de cianina a base de pirazol novedoso que contiene un catión de amonio cuaternario.

10 Técnica anterior

Recientemente, en un campo de pruebas bioquímicas y pruebas genéticas, se ha requerido sensibilidad de detección alta para determinar un analito, y la ubicación de un colorante fluorescente como agente de marcado (una sustancia de marcado) se ha convertido en un factor muy importante.

15 Entre los colorantes fluorescentes, los derivados de colorantes de cianina se usan comúnmente como colorante que tiene una características de fluorescencia en una región de infrarrojo cercano igual a o más larga que 500 nm, y, por ejemplo, se conocen Cy3, Cy5 (producidos por GE Healthcare Bioscience Co., Ltd. (nombre anterior: Amersham Bioscience Co. Ltd.) y similares como reactivo fluorescente destacado.

20 Cy3 y Cy5 tienen una estructura (colorante de cianina a base de indolenina) en la que dos esqueletos de indolenina están unidos a una cadena de polimetina, y usando esta estructura como esqueleto básico, se han desarrollado diversos derivados de colorante de cianina dirigidos, por ejemplo, a mejorar la solubilidad en agua, sensibilidad más alta evitando un estado de agregación o similares (véase, por ejemplo, bibliografía de patente 1, bibliografía de patente 2, bibliografía de patente 3, o similares). Además, como otros derivados de colorante de cianina, se han desarrollado aquellos que tienen una estructura en la que un esqueleto de azaindolenina y un esqueleto de pirazol están unidos a una cadena de polimetina (véase, por ejemplo, bibliografía de patente 4, bibliografía de patente 5, o similares). Todavía adicionalmente, se han desarrollado aquellos que tienen una estructura en la que dos esqueletos de indolenina unidos, por ejemplo, a una cadena de polimetina o similares se reticulan adicionalmente con un espaciador o similares (véase, por ejemplo, bibliografía de patente 6, bibliografía de patente 7, bibliografía de patente 8, o similares).

Además, como colorante fluorescente que presenta mayor sensibilidad y mayor solubilidad en agua en una región de longitud de onda corta que los sistemas ópticos convencionales, se han desarrollado derivados de colorante a base de cianina que tienen un esqueleto de pirazol y un esqueleto de indol (véase la bibliografía de patente 9).

Por otro lado, también puede usarse un colorante fluorescente como sustancia de patrón interno en una electroforesis. Sin embargo, en cuanto a un colorante fluorescente que tiene alta intensidad de fluorescencia y también velocidad de migración controlable, no se ha obtenido ningún colorante satisfactorio y se ha deseado un desarrollo adicional.

Bibliografía de patente 1: documento USP. n.º 5.268.486

Bibliografía de patente 2: documento USP. n.º 5.486.616

45 Bibliografía de patente 3: documento USP. n.º 5.569.766

Bibliografía de patente 4: documento JP-A-2003-034696

50 Bibliografía de patente 5: documento JP-A-2003-034697

Bibliografía de patente 6: documento USP. n.º 5.571.388

Bibliografía de patente 7: documento USP. n.º 5.800.995

55 Bibliografía de patente 8: documento WO01/02374

Bibliografía de patente 9: documento WO2007/114398

60 Sumario de invención

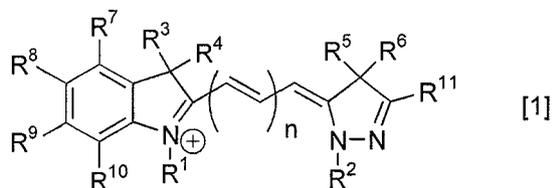
Problema que resuelve la invención

65 La presente invención se ha logrado en las circunstancias anteriores. Un objeto de la presente invención es proporcionar un derivado de colorante de cianina novedoso que tiene alta intensidad de fluorescencia en una región de longitud de onda corta, una estructura en la que un esqueleto de pirazol y un esqueleto de indol están unidos a

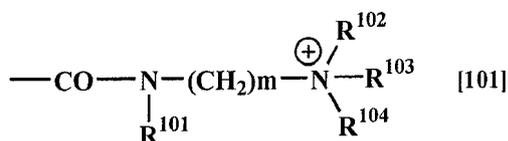
una cadena de polimetina, y además una velocidad de migración controlable introduciendo adicionalmente un catión de amonio cuaternario en una molécula que tiene dicha estructura.

Medios para resolver el problema

5 La presente invención proporciona un compuesto representado por la siguiente fórmula general [1] o una sal del mismo:



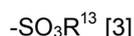
10 [en la que R¹ a R⁶ representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]:



15 (en la que R¹⁰¹ a R¹⁰⁴ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁ a C₃; m representa un número entero de desde 2 hasta 6, y dos o tres de R¹⁰² a R¹⁰⁴ junto con un átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un catión de amonio heterocíclico); o un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] que puede tener un enlace amida:



25 (en la que R¹² representa un átomo de hidrógeno, un átomo de metal alcalino, un ión de amonio orgánico, un anión o ión de amonio); o un grupo alquilo que puede tener, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] que puede tener un enlace amida:



30 (en la que R¹³ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de metal alcalino, un ión de amonio orgánico, un anión o ión de amonio); R⁷ a R¹⁰ representan cada uno independientemente un grupo alquilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo alquilsulfonilo, un grupo arilsulfonilo, un grupo amino, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2], un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3], un átomo de halógeno, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo ciano o un grupo nitro; R¹¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquinilo o un grupo arilo, y n representa un número entero de desde 0 hasta 3, y al menos uno de R¹ a R⁶ es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101].

Efectos de la invención

40 Puesto que el colorante de cianina a base de pirazol de la presente invención es un derivado de colorante de cianina novedoso que tiene una estructura en la que un esqueleto de pirazol y un esqueleto de indol están unidos a una cadena de polimetina, y se introduce un catión de amonio cuaternario en una molécula que tiene dicha estructura, el colorante tienen una alta intensidad de fluorescencia, y puede controlar el tiempo de migración en el caso de electroforesis variando el número de cationes y aniones contenidos en la molécula. Por tanto, cuando se usa el

45 colorante como sustancia de patrón interno en una electroforesis, se permite que aparezca un pico de la sustancia fluorescente en la posición deseada, y por tanto puede especificarse claramente un pico de un analito.

Además, puesto que el colorante de cianina a base de pirazol de la presente invención tiene un catión de amonio cuaternario representado por la fórmula general [101], es decir, dicho grupo catiónico tiene un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno teniendo ambos un par solitario, cuando este grupo catiónico se introduce en un colorante fluorescente, las características de fluorescencia del mismo podrían variarse. Sin embargo, se ha encontrado que el compuesto de la presente invención muestra características de fluorescencia superiores y estables aunque contiene dicho grupo catiónico.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1]

5 La figura 1 es un dibujo que muestra el método para preparar un anticuerpo marcado con ADN en el ejemplo 1.

[Figura 2]

10 La figura 2 es un dibujo que muestra una distribución del chip capilar en el ejemplo 1.

[Figura 3]

15 La figura 3 es un dibujo que muestra esquemáticamente las relaciones de posición de una muestra para la migración y una disolución de prueba en el chip capilar en el ejemplo 1.

[Figura 4]

La figura 4 es un electroferograma en el que se midió AFP en el método de la presente invención.

20 [Figura 5]

La figura 5 es un electroferograma en el que se midió PIVKA II en el método de la presente invención.

Modo para llevar a cabo la invención

25

1. Compuesto de la presente invención [1]

30 El grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101] representado por R^1 a R^6 en la fórmula general [1] puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico y preferiblemente es uno de cadena lineal e incluye habitualmente de C_1 a C_{10} , y preferiblemente de C_1 a C_6 y más preferiblemente de C_1 a C_5 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un octilo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclononilo, un grupo ciclodecilo, y similares. Entre ellos, por ejemplo, se prefiere un grupo alquilo de cadena lineal de C_1 a C_5 tal como un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo n-pentilo, y similares.

45 El grupo alquilo de C_1 a C_3 representado por R^{101} a R^{104} en la fórmula general [101] es uno de cadena lineal o ramificado, preferiblemente uno de cadena lineal, y tiene habitualmente de C_1 a C_3 , preferiblemente de C_1 a C_2 y más preferiblemente C_1 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, y similares, y entre ellos, se prefiere un grupo metilo.

Entre R^{101} en la fórmula general [101], se prefiere un átomo de hidrógeno.

50 Como R^{101} a R^{103} , entre ellos, se prefiere un caso en el que uno es un átomo de hidrógeno y otros dos son grupos alquilo (en particular, es más preferible un grupo metilo).

m es un número entero de habitualmente desde 2 hasta 6, preferiblemente desde 2 hasta 4 y más preferiblemente 2.

55 El catión de amonio heterocíclico que va a formarse mediante 2 ó 3 de R^{102} a R^{104} junto con un átomo de nitrógeno al que están unidos incluye, por ejemplo, un grupo piridinio, y un grupo N-alquil C_1 a C_3 -piridinio (por ejemplo, un grupo metilpiridinio, un grupo etilpiridinio, un grupo N-n-propilpiridinio, un grupo N-isopropilpiridinio, y similares).

60 El sustituyente en el grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101] está preferiblemente sustituido en el átomo de carbono terminal de dicho grupo alquilo.

65 Un ejemplo específico preferible del grupo representado por la fórmula general [101] incluye, por ejemplo, un grupo dimetilamonioetilcarbamoilo, un grupo trimetilamonioetilcarbamoilo, un grupo dietilamonioetilcarbamoilo, un grupo trietilamonioetilcarbamoilo, un grupo dimetilamoniopropilcarbamoilo, un grupo trimetilamoniopropilcarbamoilo, un grupo diisopropilamoniopropilcarbamoilo, un grupo triisopropilamoniopropilcarbamoilo, un grupo piridinioetilcarbamoilo, un grupo piridinopropilcarbamoilo, un grupo metilpiperidinoetilcarbamoilo, un grupo metilpiperidinopropilcarbamoilo,

un grupo etilpiperidinoetilcarbamoilo, un grupo etilpiperidinopropilcarbamoilo, y similares. Entre ellos, se prefieren un grupo dimetilamonioetilcarbamoilo y un grupo dietilamonioetilcarbamoilo, además es más preferible un grupo dimetilamonioetilcarbamoilo.

5 En la fórmula general [1], de 1 a 4, preferiblemente de 1 a 2, más preferiblemente 1 de R^1 a R^6 son grupos alquilo que tienen, como sustituyente, el grupo representado por la fórmula general [101]. Entre R^1 y R^6 en la fórmula general [1], se prefiere un grupo en el que uno cualquiera de R^1 o R^2 , preferiblemente R^1 , es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101].

10 En la fórmula general [1], el grupo alquilo que tiene un enlace amida de un grupo alquilo que tiene opcionalmente, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3], pudiendo tener ambos un enlace amida, representado por R^1 a R^6 incluye un grupo alquilo sustituido (es decir, sustituido con un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3]) o no sustituido que tiene habitualmente de 1 a 10 enlaces amida, preferiblemente de 1 a 3 enlaces amida y más preferiblemente un enlace amida en la cadena de alquilo del mismo.

El grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene opcionalmente, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3], pudiendo tener ambos un enlace amida, representado por R^1 a R^6 puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_1 a C_{10} , preferiblemente C_1 a C_3 y más preferiblemente C_1 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un octilo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terdecilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclononilo, un grupo ciclodecilo, y similares. Entre ellos, se prefiere un grupo alquilo de cadena lineal de C_1 a C_5 tal como, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo n-pentilo.

El grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3], pudiendo tener ambos un enlace amida, representado por R^1 a R^6 incluye un grupo en el que una parte de los átomos de hidrógeno en dicho grupo alquilo que puede tener un enlace amida están sustituidos por dicho sustituyente (un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3]). Entre ellos, se prefiere un grupo en el que dicho sustituyente está sustituido en el átomo de carbono terminal en dicho grupo alquilo.

Entre R^1 y R^6 en la fórmula general [1], se prefiere un grupo alquilo que tiene de C_1 a C_5 en el que uno cualquiera de R^1 o R^2 (preferiblemente R^2), uno cualquiera de R^3 o R^4 y uno cualquiera de R^5 o R^6 tiene, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3].

En las fórmulas generales [2] y [3], el átomo de metal alcalino representado por R^{12} y R^{13} incluye, por ejemplo, un átomo de litio, un átomo de sodio, un átomo de potasio, un átomo de rubidio, y similares. Entre ellos, se prefieren un átomo de sodio y un átomo de potasio, en particular, es más preferible un átomo de sodio.

Al menos uno de R^1 a R^6 (preferiblemente R^1) en la fórmula general [1] es preferiblemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]. El número del grupo representado por la fórmula general [101] contenido en el compuesto representado por la fórmula general [1] de la presente invención es habitualmente un número entero de desde 1 hasta 6, preferiblemente desde 1 hasta 4, más preferiblemente desde 1 hasta 2, y lo más preferiblemente 1.

El ion de amonio orgánico representado por R^{12} y R^{13} incluye, por ejemplo, un ion trialquilamonio y similares. Dicho ion trialquilamonio puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_1 a C_{10} , y preferiblemente de C_1 a C_6 . Específicamente, el ion trialquilamonio incluye, por ejemplo, un ion trimetilamonio, un ion trietilamonio, un ion tri-n-propilamonio, un ion triisopropilamonio, un ion tributilamonio, un ion tripentilamonio, un ion trihexilamonio, un ion triheptilamonio, un ion trioctilamonio, un ion trinonilamonio, un ion tridecilamonio, un ion triciclopropilamonio, un ion triciclobutilamonio, un ion triciclopentilamonio, un ion triciclohexilamonio, un ion tricicloheptilamonio, un ion triciclooctilamonio, un ion triciclononilamonio, un ion triciclodecilamonio, y similares. Entre ellos, se prefiere un ion trimetilamonio o un ion trietilamonio, en particular, es más preferible un ion trietilamonio.

En la fórmula general [2], el grupo alquilo que tiene de C_1 a C_{10} representado por R^{12} puede ser cualquiera de uno de

cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_1 a C_{10} , preferiblemente de C_1 a C_6 y más preferiblemente de C_1 a C_3 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un octilo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclonoilo, un grupo ciclodecilo, y similares.

Un ejemplo preferido del grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] incluye, por ejemplo, un grupo carboxilo (-COOH), un anión del mismo [un carboxilato (-COO-)], una sal de metal alcalino del mismo (por ejemplo, una sal de litio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de rubidio, y similares), una sal de amonio del mismo, una sal de amonio orgánico del mismo (por ejemplo, una sal de trimetilamonio, una sal de trietilamonio, una sal de tripropilamonio, y similares), y similares.

Un ejemplo preferido del grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] incluye, por ejemplo, un grupo sulfo (-SO₃H) un anión del mismo [un sulfonato (-SO₃⁻)], una sal de metal alcalino del mismo (por ejemplo, una sal de litio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de rubidio, y similares), una sal de amonio del mismo, una sal de amonio orgánico del mismo (por ejemplo, una sal de trimetilamonio, una sal de trietilamonio, una sal de tripropilamonio, y similares), y similares.

En la fórmula general [1], se prefiere un compuesto en el que uno cualquiera de R^1 o R^2 es un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] tal como, por ejemplo, un grupo carboxietilo, un grupo carboxipropilo, un grupo carboxibutilo, un grupo carboxipentilo, un anión del mismo (un carboxilato), un grupo de sal de metal alcalino del mismo (por ejemplo, una sal de sodio, una sal de potasio, y similares), un grupo de una sal de amonio orgánico del mismo (por ejemplo, una sal de trimetilamonio, una sal de trietilamonio, y similares), y similares, o un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] tal como, por ejemplo, un grupo sulfoetilo, un grupo sulfopropilo, un grupo sulfobutilo, un grupo sulfopentilo, un anión del mismo (un sulfonato), un grupo de una sal de metal alcalino del mismo (por ejemplo, una sal de sodio, una sal de potasio, y similares), un grupo de una sal de amonio orgánico del mismo (por ejemplo, una sal de trimetilamonio, una sal de trietilamonio, una sal de amonio, y similares), y similares, y el otro es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]. En particular, es más preferible un caso en el que R^1 es un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], R^2 es un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3].

Además, en la fórmula general [1], como combinación preferida de R^3 y R^4 y combinación preferida de R^5 y R^6 , existe un caso en el que uno cualquiera de los mismos (es decir, uno cualquiera de R^3 o R^4 y uno cualquiera de R^5 o R^6) es un grupo alquilo de C_1 a C_5 (por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, y similares), y los otros son grupos alquilo de C_1 a C_5 que tienen, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] tal como, por ejemplo, un grupo carboxietilo, un grupo carboxipropilo, un grupo carboxibutilo, un grupo carboxipentilo, un anión del mismo (un carboxilato), un grupo de sal de metal alcalino del mismo (por ejemplo, una sal de sodio, una sal de potasio, y similares), un grupo de una sal de amonio del mismo o un grupo de una sal de amonio orgánico del mismo (por ejemplo, una sal de trimetilamonio, una sal de trietilamonio, y similares), y similares, o un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] tal como, por ejemplo, un grupo sulfoetilo, un grupo sulfopropilo, un grupo sulfobutilo, un grupo sulfopentilo, un anión del mismo (un sulfonato), un grupo de sal de metal alcalino del mismo (por ejemplo, una sal de sodio, una sal de potasio, y similares), un grupo de una sal de amonio orgánico del mismo (por ejemplo, una sal de trimetilamonio, una sal de trietilamonio, una sal de amonio, y similares). En particular, es más preferible un caso en el que uno cualquiera de los mismos (es decir, uno cualquiera de R^3 o R^4 y uno cualquiera de R^5 o R^6) es un grupo alquilo de C_1 a C_5 , y el otro es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3].

En la fórmula general [1], el grupo alquilo representado por R^7 a R^{10} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_1 a C_6 , y preferiblemente de C_1 a C_3 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, y similares.

El grupo alquinilo representado por R^7 a R^{10} incluye el grupo de habitualmente C_2 a C_6 , y preferiblemente de C_2 a C_4 , y específicamente incluye, por ejemplo, un grupo etinilo, un grupo 2-propinilo, un grupo 3-butinilo, un grupo 1-metil-2-propinilo, un grupo 4-pentinilo, un grupo 2-metil-4-pentinilo, un grupo 5-hexinilo, y similares.

- 5 El grupo arilo representado por R^7 a R^{10} incluye el grupo de habitualmente C_6 a C_{10} , y específicamente incluye, por ejemplo, un grupo fenilo, un grupo naftilo, y similares.

10 El grupo alcoxilo representado por R^7 a R^{10} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_1 a C_6 , y preferiblemente de C_1 a C_3 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metoxilo, un grupo etoxilo, un grupo n-propoxilo, un grupo isopropoxilo, un grupo n-butoxilo, un grupo isobutoxilo, un grupo sec-butoxilo, un grupo terc-butoxilo, un grupo n-pentiloxilo, un grupo isopentiloxilo, un grupo sec-pentiloxilo, un grupo terc-pentiloxilo, un grupo neopentiloxilo, un grupo n-hexiloxilo, un grupo isohexiloxilo, un grupo sec-hexiloxilo, un grupo terc-hexiloxilo, un grupo neohexiloxilo, un grupo ciclopropoxilo, un grupo ciclohexiloxilo, un grupo ciclohexiloxilo, y similares.

15 El grupo ariloxilo representado por R^7 a R^{10} es el grupo de habitualmente C_6 a C_{10} , y específicamente incluye, por ejemplo, un grupo feniloxilo, un grupo naftoxilo, y similares.

20 El grupo alquilsulfonilo representado por R^7 a R^{10} es el grupo en el que el grupo -OH del grupo sulfo ($-SO_3H$) está sustituido por un grupo alquilo, y puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_1 a C_6 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilsulfonilo, un grupo etilsulfonilo, un grupo n-propilsulfonilo, un grupo isopropilsulfonilo, un grupo n-butilsulfonilo, un grupo isobutilsulfonilo, un grupo sec-butilsulfonilo, un grupo terc-butilsulfonilo, un grupo n-pentilsulfonilo, un grupo isopentilsulfonilo, un grupo sec-pentilsulfonilo, un grupo terc-pentilsulfonilo, un grupo neopentilsulfonilo, un grupo n-hexilsulfonilo, un grupo isohexilsulfonilo, un grupo sec-hexilsulfonilo, un grupo terc-hexilsulfonilo, un grupo neohexilsulfonilo, un grupo ciclopropilsulfonilo, un grupo ciclobutilsulfonilo, un grupo ciclohexilsulfonilo, y similares.

25 El grupo arilsulfonilo representado por R^7 a R^{10} es el grupo en el que el grupo -OH del grupo sulfo ($-SO_3H$) está sustituido por un grupo arilo, y puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_6 a C_{10} . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo fenilsulfonilo, un grupo naftilsulfonilo, y similares.

30 El átomo de halógeno representado por R^7 a R^{10} incluye, por ejemplo, un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo, un átomo de yodo, y similares.

35 El grupo amino sustituido representado por R^7 a R^{10} es el grupo en el que 1 ó 2 átomos de hidrógeno de un grupo amino están sustituidos por un sustituyente, y este sustituyente incluye, por ejemplo, un grupo alquilo, un grupo alcoxicarbonilo, un grupo acilo, un grupo sulfo, y similares.

40 El grupo alquilo mostrado a modo de ejemplo como sustituyente del grupo amino sustituido representado por R^7 a R^{10} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_1 a C_{10} , y preferiblemente de C_1 a C_6 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un grupo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclonoilo, un grupo ciclodecilo, y similares.

45 El grupo alcoxicarbonilo mostrado a modo de ejemplo como sustituyente del grupo amino sustituido representado por R^7 a R^{10} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_1 a C_{10} , y preferiblemente de C_1 a C_6 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metoxicarbonilo, un grupo etoxicarbonilo, un grupo n-propoxicarbonilo, un grupo isopropoxicarbonilo, un grupo n-butoxicarbonilo, un grupo isobutoxicarbonilo, un grupo sec-butoxicarbonilo, un grupo terc-butoxicarbonilo, un grupo n-pentiloxicarbonilo, un grupo isopentiloxicarbonilo, un grupo sec-pentiloxicarbonilo, un grupo terc-pentiloxicarbonilo, un grupo neopentiloxicarbonilo, un grupo n-hexiloxicarbonilo, un grupo isohexiloxicarbonilo, un grupo sec-hexiloxicarbonilo, un grupo terc-hexiloxicarbonilo, un grupo neohexiloxicarbonilo, un grupo n-heptiloxicarbonilo, un grupo isoheptiloxicarbonilo, un grupo sec-heptiloxicarbonilo, un grupo terc-heptiloxicarbonilo, un grupo neoheptiloxicarbonilo, un grupo n-octiloxicarbonilo, un grupo isooctiloxicarbonilo, un grupo sec-octiloxicarbonilo, un grupo terc-octiloxicarbonilo, un grupo neooctiloxicarbonilo, un grupo n-noniloxicarbonilo, un grupo isononiloxicarbonilo, un grupo sec-noniloxicarbonilo, un grupo terc-noniloxicarbonilo, un grupo neononiloxicarbonilo, un grupo n-deciloxicarbonilo, un grupo isodeciloxicarbonilo, un grupo sec-deciloxicarbonilo, un grupo terc-deciloxicarbonilo, un grupo neodeciloxicarbonilo, un grupo ciclopropoxicarbonilo, un grupo ciclobutoxicarbonilo, un grupo ciclohexiloxicarbonilo, un grupo cicloheptiloxicarbonilo, un grupo ciclooctiloxicarbonilo, un grupo ciclonoiloxicarbonilo, un grupo ciclodeciloxicarbonilo, y similares.

ciclooctiloxicarbonilo, un grupo ciclononiloxicarbonilo, un grupo ciclodeciloxicarbonilo, y similares.

El grupo acilo mostrado a modo de ejemplo como sustituyente del grupo amino sustituido representado por R^7 a R^{10} incluye, por ejemplo, un grupo derivado de ácido carboxílico alifático, un grupo derivado de ácido carboxílico aromático, y similares.

Dicho grupo acilo derivado de ácido carboxílico alifático puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_2 a C_{20} , preferiblemente de C_2 a C_{15} , más preferiblemente de C_2 a C_{10} , y aún más preferiblemente de C_2 a C_6 , y puede tener además un doble enlace en una cadena. Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo acetilo, un grupo propionilo, un grupo butirilo, un grupo isobutirilo, un grupo valerilo, un grupo isovalerilo, un grupo pivaloilo, un grupo hexanoilo, un grupo heptanoilo, un grupo octanoilo, un grupo decanoilo, un grupo lauroilo, un grupo miristoilo, un grupo palmitoilo, un grupo estearoilo, un grupo icosanoilo, un grupo acrililo, un grupo metacrililo, un grupo crotonoilo, un grupo oleoilo, y similares.

Dicho grupo acilo derivado de ácido carboxílico aromático es el grupo que tiene habitualmente de C_7 a C_{15} , y preferiblemente de C_7 a C_{11} , y específicamente incluye, por ejemplo, un grupo benzoilo, un grupo naftoilo, un grupo antoilo, y similares.

Un ejemplo preferible de R^7 a R^{10} incluye un caso en el que tres de R^7 a R^{10} son átomos de hidrógeno, y uno de los restantes es el grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3]. Entre dichos grupos derivados de un ácido sulfónico, un grupo preferible es, por ejemplo, un grupo sulfo, un anión del mismo (es decir, un sulfonato), una sal de metal alcalino del mismo, una sal de amonio orgánico del mismo, y similares, en particular, un grupo más preferible es, por ejemplo, un grupo sulfo, un sulfonato, una sal de metal alcalino del mismo (por ejemplo, una sal de sodio, y similares), y es particularmente preferible un caso en el que R^8 es el grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3].

En la fórmula general [1], el grupo alquilo representado por R^{11} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene habitualmente de C_1 a C_{10} , y preferiblemente de C_1 a C_6 , más preferiblemente de C_1 a C_4 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un grupo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclononilo, un grupo ciclodecilo, y similares.

El grupo alquinilo representado por R^{11} es un grupo que tiene habitualmente de C_2 a C_6 , y preferiblemente de C_2 a C_4 , y específicamente incluye, por ejemplo, un grupo etinilo, un grupo 2-propinilo, un grupo 3-butinilo, un grupo 1-metil-2-propinilo, un grupo 4-pentinilo, un grupo 2-metil-4-pentinilo, un grupo 5-hexinilo, y similares.

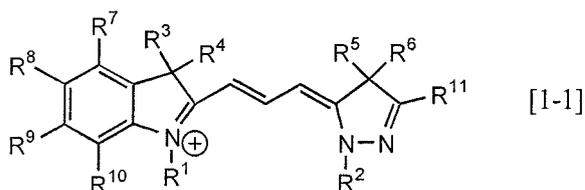
El grupo arilo representado por R^{11} es un grupo que tiene habitualmente de C_6 a C_{10} , y específicamente incluye, por ejemplo, un grupo fenilo, un grupo naftilo, y similares.

Entre R^{11} en la fórmula general [1], un grupo preferible es un grupo alquilo, en particular, un grupo más preferible es, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo n-hexilo, y similares.

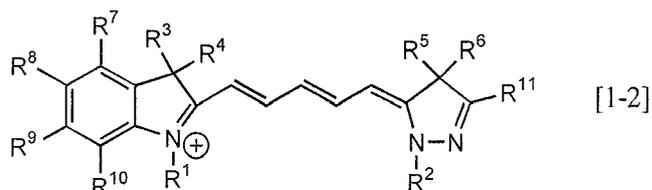
En la fórmula general [1], n representa un número entero de habitualmente desde 0 hasta 3, preferiblemente de 1 ó 2 y más preferiblemente 2.

Para el grupo (por ejemplo, un grupo sulfo, y similares) derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] que va a contenerse en el compuesto de la presente invención en la fórmula general [1], es preferible que se introduzcan más grupos debido a que el grupo mejora la solubilidad en agua, inhibe la extinción de la fluorescencia debido a la agregación entre dichas moléculas de colorante y aumenta la intensidad de fluorescencia. El grupo está contenido en el compuesto de la presente invención en una cantidad de habitualmente 1 a 4, preferiblemente de 3 a 4 y más preferiblemente 4. Además, cuando están contenidos 4 grupos derivados de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] en el compuesto de la presente solicitud, la ubicación preferible en la que van a introducirse es tal como sigue. Es decir, el grupo se introduce preferiblemente en o bien R^3 o bien R^4 en la fórmula general [1], o bien R^5 o bien R^6 y o bien R^1 o bien R^2 (preferiblemente R^2) como grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3], y además en R^8 como grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3].

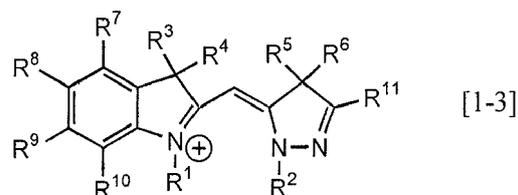
El compuesto representado por la fórmula general [1] incluye, por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula general [1-1]:



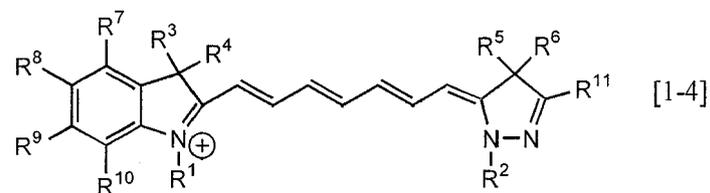
5 (en la que R¹ a R¹¹ son iguales que anteriormente) (que corresponde al caso en el que n = 1 en la fórmula general [1]); un compuesto representado por la fórmula general [1-2]:



10 (en la que R¹ a R¹¹ son iguales que anteriormente) (que corresponde al caso en el que n = 2 en la fórmula general [1]); un compuesto representado por la fórmula general [1-3]:

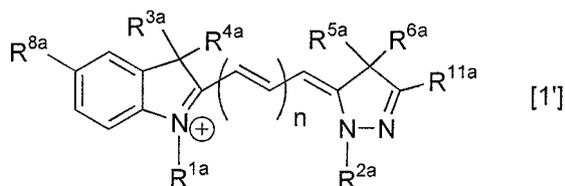


15 (en la que R¹ a R¹¹ son iguales que anteriormente) (que corresponde al caso en el que n = 0 en la fórmula general [1]); y un compuesto representado por la fórmula general [1-4]:



20 (en la que R¹ a R¹¹ son iguales que anteriormente) (que corresponde al caso en el que n = 3 en la fórmula general [1]), y entre ellos, se prefiere el compuesto representado por la fórmula general [1-1] o [1-2].

Además, entre los compuestos [1] de la presente invención, por ejemplo, se prefiere un compuesto representado por la siguiente fórmula general [1']:



25 (en la que R^{1a} a R^{6a} representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], o un grupo alquilo que tiene opcionalmente, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3]; R^{8a} representa un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3]; R^{11a} representa un grupo alquilo; y n es el mismo que anteriormente; y al menos uno de R^{1a} a R^{6a} representa un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]).

30

En la fórmula general [1'], el grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101] representado por R^{1a} a R^{6a} incluye los mismos grupos que los mostrados como ejemplo para el grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101] representado por R¹ a R⁶ en la fórmula general [1] mencionada anteriormente.

El grupo alquilo que tiene opcionalmente, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] representado por R^{1a} a R^{6a} o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] incluye los mismos grupos que los mostrados como ejemplo para el grupo alquilo que tiene opcionalmente, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] del grupo alquilo que tiene opcionalmente, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] pudiendo tener ambos un enlace amida, representado por R¹ a R⁶ en la fórmula general [1] mencionada anteriormente.

R^{3a} y R^{4a} incluyen cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene opcionalmente como sustituyente un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3]. Entre estos grupos, se prefiere un caso en el que uno cualquiera es un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3], y el otro es un grupo alquilo.

R^{5a} y R^{6a} representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene opcionalmente como sustituyente un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3]. Entre estos grupos, se prefiere un caso en el que uno cualquiera es un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3], y el otro es un grupo alquilo.

El grupo alquilo representado por R^{11a} incluye los mismos grupos que los mostrados como ejemplo para el grupo alquilo representado por R¹¹ en la fórmula general [1] mencionada anteriormente.

En la fórmula general [1'], al menos uno de R^{1a} a R^{6a} es un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo representado por la fórmula general [101].

Ejemplos específicos preferidos del compuesto representado por la fórmula general [1-2] incluyen, por ejemplo, los mostrados en la siguiente tabla 1, y similares.

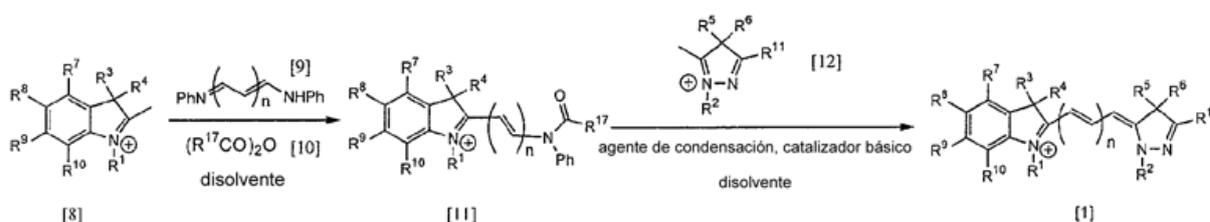
[Tabla 1]

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	R ¹⁰	R ¹¹
1-2-1	-(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₂ NH(CH ₃) ₂ ⁺	-(CH ₂) ₅ SO ₃ ⁻	-CH ₃	-(CH ₂) ₅ SO ₃ Na	-CH ₃	-(CH ₂) ₂ COOH	H	-SO ₃ Na	H	H	-CH ₃
1-2-2	-(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₂ NH(CH ₃) ₂ ⁺	-(CH ₂) ₅ SO ₃ H	-CH ₃	-(CH ₂) ₅ SO ₃ Na	-CH ₃	-(CH ₂) ₂ COOC ₂ H ₅	H	-SO ₃ Na	H	H	-CH ₃
1-2-3	-(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₂ NH(CH ₃) ₂ ⁺	-(CH ₂) ₅ SO ₃ ⁻	-CH ₃	-(CH ₂) ₅ SO ₃ Na	-CH ₃	-(CH ₂) ₃ SO ₃ Na	H	-SO ₃ Na	H	H	-CH ₃
1-2-4	-(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₂ NH(CH ₃) ₂ ⁺	-(CH ₂) ₅ COO ⁻	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-(CH ₂) ₃ SO ₃ Na	H	-SO ₃ Na	H	H	-CH ₃
1-2-5	-(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₂ NH(CH ₃) ₂ ⁺	-(CH ₂) ₅ SO ₃ H	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-(CH ₂) ₂ COOH	H	-SO ₃ Na	H	H	-CH ₃
1-2-6	-(CH ₂) ₅ CONH(CH ₂) ₂ NH(CH ₃) ₂ ⁺	-(CH ₂) ₅ SO ₃ H	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	H	-SO ₃ Na	H	H	-CH ₃

2. Método para sintetizar el compuesto [1] de la presente invención

2-1. Síntesis de un complejo de compuesto de indolenina-compuesto de pirazol (que corresponde al compuesto representado por la fórmula general [1] de la presente invención)

El compuesto representado por la fórmula general [1] puede sintetizarse, por ejemplo, mediante el siguiente método:



* Ph = grupo fenilo

(en el que R¹⁷ representa un grupo alquilo o un grupo arilo, y R¹ a R¹¹ y n son iguales que anteriormente).

En las fórmulas generales [10] y [11], el grupo alquilo representado por R^{17} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene de C_1 a C_{10} , y preferiblemente de C_1 a C_3 . Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un grupo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclononilo, un grupo ciclodécilo, y similares.

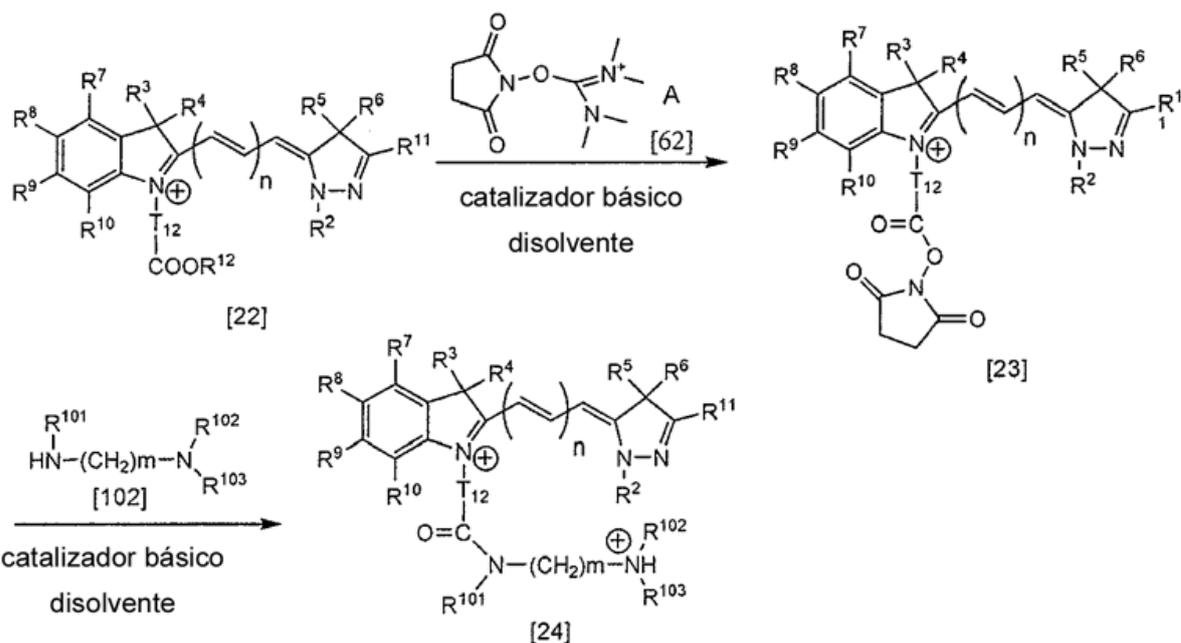
El grupo arilo representado por R^{17} incluye un grupo de habitualmente C_6 a C_{10} , y específicamente incluye, por ejemplo, un grupo fenilo, un grupo naftilo, y similares.

Es decir, en primer lugar, se disuelven un compuesto de indolenina representado por la fórmula general [8] (un resto de esqueleto de indolenina), un compuesto representado por la fórmula general [9] [de 1 a 2 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [8]] y un anhídrido de ácido representado por la fórmula general [10] [de 1 a 20 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [8]] (por ejemplo, anhídrido acético, anhídrido propiónico, anhídrido butírico, anhídrido benzoico, y similares) en un disolvente (ácidos carboxílicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, y similares, nitrilos tales como, por ejemplo, acetonitrilo, propionitrilo, n-butironitrilo, y similares) si es necesario, y se hacen reaccionar a de 0 a 150°C (preferiblemente de 40 a 120°C) durante de 0,1 a 24 horas (preferiblemente de 0,5 a 12 horas y más preferiblemente de 1 a 8 horas) para obtener un compuesto representado por la fórmula general [11].

Posteriormente, se hacen reaccionar el compuesto representado por la fórmula general [11] y un compuesto representado por la fórmula general [12] (un resto de esqueleto de pirazol) [de 0,5 a 10 veces, preferiblemente de 1 a 5 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [11]] en presencia de un catalizador básico (aminas orgánicas tales como, por ejemplo, piridina, trietilamina, N,N-dimetilaminilina, piperidina, 4-dimetilaminopiridina, 1,5-diazabicyclo[4.3.0]nona-5-eno, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno, tri-n-butilamina, y similares; hidruros de metal tales como, por ejemplo, hidruro de sodio, y similares; compuestos de metal alcalino básicos tales como, por ejemplo, n-butillitio, y similares), usando un agente de deshidratación-condensación [agentes de deshidratación inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido sulfúrico concentrado, pentóxido de fósforo, cloruro de zinc anhidro; carbodiimidas tales como, por ejemplo, dicitlohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida); anhídrido acético; ácido polifosfórico; carbonildiimidazol; cloruro de p-toluenosulfonilo; y similares], y si es necesario en un disolvente (amidas tales como, por ejemplo, N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA), acetamida, N-metilpirrolidona; nitrilos tales como, por ejemplo, acetonitrilo, propionitrilo, n-butironitrilo; alcoholes tales como, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, 1,4-butanodiol; éteres tales como, por ejemplo, tetrahidrofurano, dioxano, anisol, etilenglicol monoetil éter; sulfóxidos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido) a de 0 a 150°C (preferiblemente de 40 a 120°C) durante de 0,1 a 24 horas (preferiblemente de 0,5 a 12 horas y más preferiblemente de 1 a 8 horas), para obtener el compuesto deseado representado por la fórmula general [1].

2-2. Etapa de introducción de catión

Se explicará un método para introducir el grupo representado por la fórmula general [101] relevante para la presente invención tomando como ejemplo un caso en el que se sintetiza un compuesto representado por la fórmula general [24] [es decir, un compuesto que corresponde a un caso en el que R^1 es un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo representado por la fórmula general [101] en la fórmula general [1] en la que R^{104} es un átomo de hidrógeno], entre los compuestos representado por la fórmula general [1]:



(en las que T_{12} representa un grupo alqueno, A representa un tetrafluoroborato o un hexafluorofosfato, y R^3 a R^{12} , R^{101} a R^{103} , m y n son iguales que anteriormente).

5 Debe observarse que el compuesto representado por la fórmula general [22] corresponde a un compuesto en el que R^1 es un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] (es decir, un grupo que corresponde al grupo $-T_{12}-COOR^{12}$) entre los compuestos representados por la fórmula general [1].

10 En las fórmulas generales [22] a [24], el grupo alqueno representado por T_{12} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal o ramificado, y preferiblemente es uno de cadena lineal. El grupo tiene habitualmente de C_1 a C_6 , y preferiblemente de C_1 a C_4 , y específicamente incluye un grupo alqueno de cadena lineal tal como, por ejemplo, un grupo metileno, un grupo etileno, un grupo trimetileno, un grupo tetrametileno, un grupo pentametileno, un grupo hexametileno; un grupo alqueno ramificado tal como un grupo etilideno, un grupo propilideno, un grupo isopropilideno, un grupo etiletileno, un grupo 1,2-dimeteletileno, un grupo 1,2-dietiletileno, un grupo 1,2-di-n-propiletileno, un grupo 1,2-di-n-butiletileno; y similares, y entre ellos, se prefiere un grupo alqueno de cadena lineal, en particular, son más preferibles un grupo etileno, un grupo pentametileno y similares.

20 Es decir, se hace reaccionar un compuesto representado por la fórmula general [22] con un reactivo de succinimidación tal como, por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula general [62] (de 1 a 10 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [22]) en presencia de un catalizador básico (aminas orgánicas tales como, por ejemplo, N-etildisopropilamina, piridina, trietilamina, N,N-dimetilanilina, piperidina, 4-dimetilaminopiridina, 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, tri-n-butilamina) en un disolvente apropiado (amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona) a de 0 a 40°C durante de 0,1 a 12 horas, para obtener un compuesto representado por la fórmula general [23].

30 Posteriormente, se hace reaccionar el compuesto representado por la fórmula general [23] con un reactivo de cationización, por ejemplo, representado por la fórmula general [102] (de 1 a 5 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [23]) en un disolvente apropiado (amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona) a de 0 a 40°C durante de 0,1 a 12 horas, para obtener un compuesto representado por la fórmula general [24].

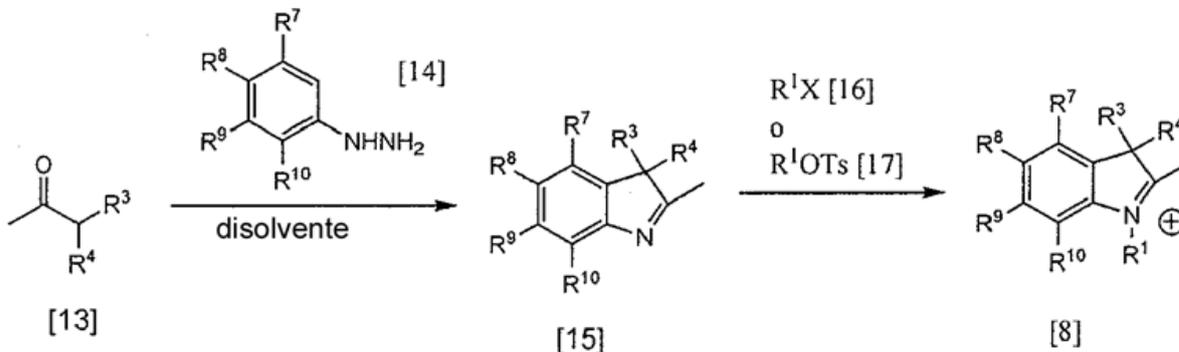
35 El reactivo de succinimidación relevante para la presente invención incluye no sólo el compuesto representado por la fórmula general [62] sino también todos los que se usan habitualmente en este campo, y específicamente, por ejemplo, carbonato de di(N-succinimido) (DSC), tetrafluoroborato de 2-succinimida-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU), tetrafluoroborato de 2-(5-norborneno-2,3-dicarboxiimida)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), y similares. Además, cuando se lleva a cabo la reacción de succinimidación, puede llevarse a cabo la reacción en presencia de un catalizador básico apropiado (aminas orgánicas tales como, por ejemplo, trietilamina, N-etildisopropilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, piperidina, 4-dimetilaminopiridina, 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, tri-n-butilamina, y similares).

40

2-3. Síntesis de compuesto de indolenina

A continuación se explicará un método para sintetizar un compuesto representado por la fórmula general [8] (un resto de esqueleto de indolenina):

5



* TS = grupo tosilo (p-toluenosulfonilo)

(en el que X representa un átomo de halógeno, R^1 , R^3 , R^4 y R^7 a R^{10} son iguales que anteriormente).

10 En la fórmula general [16], el átomo de halógeno representado por X incluye, por ejemplo, un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo, un átomo de yodo, y similares.

15 Es decir, se hacen reaccionar un compuesto de cetona representado por la fórmula general [13] y un compuesto representado por la fórmula general [14] en un disolvente apropiado (ácidos carboxílicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico; alcoholes tales como, por ejemplo, etilenglicol, 1,4-butanodiol; y similares) a de 40 a 250°C durante de 0,1 a 24 horas, para obtener un compuesto representado por la fórmula general [21] (véase, por ejemplo, Journal of Organic Chemistry, 42(14), 2474-80, 1977, etc.).

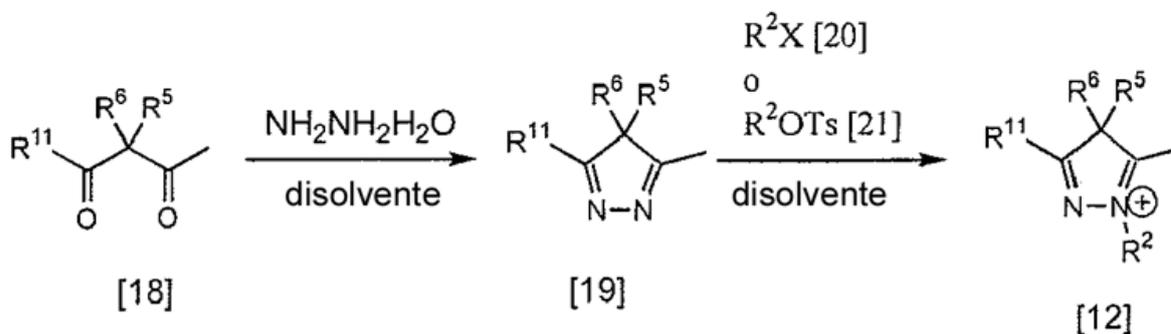
20 Posteriormente, se disuelven un compuesto representado por la fórmula general [15] y un haluro representado por la fórmula general [16] o un compuesto de tosilato representado por la fórmula general [17] en un disolvente apropiado (hidrocarburos aromáticos halogenados tales como, por ejemplo, clorobenceno, 1,2-diclorobenceno; hidrocarburos halogenados tales como, por ejemplo, 1,2-dicloroetano; hidrocarburos aromáticos tales como, por ejemplo, tolueno, xileno, benceno; amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona; y similares), y se hace reaccionar la disolución a de 40 a 200°C durante de 1 a 24 horas, para obtener un compuesto representado por la fórmula general [8] (véase, por ejemplo, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 947-952, 1984, etc.).

30 El compuesto de cetona representado por la fórmula general [13] puede usar un producto comercial (por ejemplo, 3-metil-2-butanona, 3-metil-2-pentanona, 3-metil-2-hexanona, 1-ciclopropiletanona, 1-ciclobutiletanona, y similares), o uno sintetizado como es apropiado mediante un método usual. Un ejemplo de síntesis de dicho compuesto de cetona incluye, por ejemplo, un método en el que se hace reaccionar 2-metilacetoacetato de etilo con un compuesto que tiene un grupo saliente (por ejemplo, un átomo de halógeno, un grupo tosilato, y similares) en presencia de un catalizador básico (hidruros de metal tales como, por ejemplo, hidruro de sodio, hidruro de potasio; carbonato de metal alcalino tal como, por ejemplo, carbonato de litio, carbonato de sodio, carbonato de potasio; alcóxidos de metal alcalino tales como, por ejemplo, metóxido de sodio, etóxido de sodio, terc-butóxido de potasio; compuestos de metal alcalino básicos tales como, por ejemplo, n-butil-litio; amidas de metal alcalino tales como, por ejemplo, diisopropilamida de litio; y similares) en un disolvente apropiado (amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona; alcoholes tales como, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol; éteres tales como, por ejemplo, tetrahidrofurano, dioxano, etilenglicol monoetil éter; sulfóxidos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido; y similares) a de -80 a 100°C durante de 0,1 a 24 horas, posteriormente se somete la disolución resultante a descarboxilación usando un catalizador ácido (véase, por ejemplo, Modern Synthetic Reactions, California, 2ª ed., págs. 492, 510 y 756 (1972)), y similares.

45 El compuesto representado por la fórmula general [14] puede usar un producto comercial, o uno sintetizado como es apropiado mediante un método usual.

2-4. Síntesis de un compuesto de pirazol

A continuación se explicará un método para sintetizar el compuesto representado por la fórmula general [12] (un resto de esqueleto de pirazol):



(en las que R^2 , R^5 a R^6 , R^{11} y X son iguales que anteriormente).

Es decir, se someten un compuesto de dicetona representado por la fórmula general [18] e hidrazina a reacción de deshidratación en un disolvente apropiado (alcoholes tales como, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, y similares) a de 60 a 100°C durante de 1 a 4 horas, para obtener un compuesto de 4H-pirazol representado por la fórmula general [19] (véase, por ejemplo, Adv. Heterocycle. Chem. vol. 34, 53-78, 1983, etc.).

Posteriormente, se somete el compuesto de 4H-pirazol representado por la fórmula general [19] y un haluro representado por la fórmula general [20] o un compuesto de tosilato representado por la fórmula general [21] a reacción de N-alkilación en un disolvente apropiado (hidrocarburos aromáticos halogenados tales como, por ejemplo, clorobenceno, 1,2-diclorobenceno; hidrocarburos halogenados tales como, por ejemplo, 1,2-dicloroetano; hidrocarburos aromáticos tales como, por ejemplo, tolueno, xileno, benceno; amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona; y similares) a de 80 a 140°C durante de 1 a 12 horas, para obtener un compuesto representado por la fórmula general [12] (véase, por ejemplo, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 947-952, 1984, etc.).

El compuesto de dicetona representado por la fórmula general [18] puede usar un producto comercial (por ejemplo, 3,3-dimetil-2,4-pentan-diona, y similares), o uno sintetizado como es apropiado mediante un método usual. Un ejemplo de la síntesis de dicho compuesto de dicetona incluye, por ejemplo, un método en el que se hace reaccionar 3-metil-2,4-pentandiona o éster de 4-acetil-5-oxohexanoato de etilo con un compuesto que tiene un grupo saliente (por ejemplo, un átomo de halógeno, un grupo tosilato, y similares) en presencia de un catalizador básico (hidruros de metal tales como, por ejemplo, hidruro de sodio, hidruro de potasio; carbonatos de metal alcalino tales como, por ejemplo, carbonato de litio, carbonato de sodio, carbonato de potasio; alcóxidos de metal alcalino tales como, por ejemplo, metóxido de sodio, etóxido de sodio, terc-butóxido de potasio; compuestos de metal alcalino básicos tales como, por ejemplo, n-butil-litio; amidas de metal alcalino tales como, por ejemplo, diisopropilamida de litio; y similares) en un disolvente apropiado (amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona; alcoholes tales como, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol; éteres tales como, por ejemplo, tetrahidrofuranó, dioxano, etilenglicol monoetil éter; sulfóxidos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido; y similares) a de -80 a 100°C durante de 0,1 a 24 horas (véase, por ejemplo, Modern Synthetic Reactions, California, 2ª ed., págs. 492, 510, 756 (1972), etc.), y similares.

3. Propiedades del compuesto de la presente invención [1]

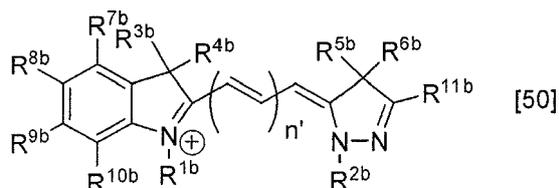
El compuesto [1] de la presente invención así obtenido es una sustancia fluorescente que tiene una longitud de onda de excitación máxima de alrededor de 635 nm, y se esperan usos tales como, por ejemplo, sustancia de marcado fluorescente, sustancia de patrón interno en electroforesis.

Puesto que el compuesto [1] de la presente invención tiene un grupo representado por la fórmula general [101] (es decir, un grupo de catión amonio) en una molécula del mismo, cuando el compuesto se somete a una electroforesis desde el lado positivo hasta el lado negativo, puede retrasarse el tiempo de migración mediante la presencia del catión amonio relevante para la presente invención. Además, puesto que es posible introducir un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] como grupo anión en el compuesto de la presente invención, se hace posible sintetizar el compuesto de la presente invención que tiene una movilidad controlada en una electroforesis.

En particular, cuando el compuesto [1] de la presente invención se usa como sustancia de patrón interno junto con un compuesto que tiene el mismo esqueleto básico que el compuesto [1] de la presente invención y en el que el grupo representado por la fórmula general [101] relevante para la presente invención está sustituido por un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico

representado por la fórmula general [3] (es decir, un grupo anión) (a continuación en el presente documento, denominado un compuesto que contiene grupo anión relevante para la presente invención), se hace posible acortar el tiempo de migración del compuesto que contiene grupo anión relevante para la presente invención con respecto al del compuesto [1] relevante para la presente invención en la electroforesis desde el lado positivo hasta el lado negativo, para ajustar de ese modo los picos de dos sustancias de patrón interno de manera que un pico de un analito se ubica entre los picos de dos sustancias de patrón interno. Mediante este método, se hace posible identificar un pico del analito fácilmente.

Un ejemplo específico del compuesto que contiene grupo anión relevante para la presente invención incluye, por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula general [50] o una sal del mismo:



[en la que R^{1b} a R^{6b} representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene opcionalmente, como sustituyente, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] que puede tener un enlace amida:



(en la que R¹² es el mismo que anteriormente), o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] que puede tener un enlace amida:



(en la que R¹³ es el mismo que anteriormente), R^{7b} a R^{10b} representan cada uno independientemente un grupo alquilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo alquilsulfonilo, un grupo arilsulfonilo, un grupo amino sustituido, un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2], un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3], un átomo de halógeno, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo ciano o un grupo nitro, R^{11b} representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquinilo o un grupo arilo, y n' representa un número entero de desde 0 hasta 3, y al menos uno de R^{1b} a R^{6b} es un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3], o tiene estos grupos como sustituyente]. El compuesto descrito anteriormente representado por la fórmula general [50] o una sal del mismo es una sustancia fluorescente que tiene una longitud de onda de excitación de alrededor de 635 nm, y puede ser una sustancia útil de patrón interno en una medición mediante detección de fluorescencia.

El grupo alquilo que tiene opcionalmente como sustituyente un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] pudiendo tener ambos un enlace amida representado por R^{1b} a R^{6b} en la fórmula general [50] incluye los mismos grupos que los mostrados como ejemplo para el grupo alquilo que tiene opcionalmente, como sustituyente un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] pudiendo tener ambos un enlace amida representado por R¹ a R⁶ en la fórmula general [1].

El grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3] pudiendo tener ambos un enlace amida representado por R^{1b} a R^{6b} incluye uno en el que una parte de átomos de hidrógeno en dicho grupo alquilo que tiene opcionalmente un enlace amida están sustituidos por dicho sustituyente (un grupo derivado de un ácido carboxílico representado por la fórmula general [2] o un grupo derivado de un ácido sulfónico representado por la fórmula general [3]), y entre ellos, se prefiere un grupo en el que dicho sustituyente está sustituido en el átomo de carbono terminal de dicho grupo alquilo.

El grupo alquilo, el grupo alquinilo, el grupo arilo, el grupo alcoxilo, el grupo ariloxilo, el grupo alquilsulfonilo, el grupo arilsulfonilo, el átomo de halógeno y el grupo amino sustituido representado por R^{7b} a R^{10b} incluyen los mismos que los mostrados como ejemplo para el grupo alquilo, el grupo alquinilo, el grupo arilo, el grupo alcoxilo, el grupo ariloxilo, el grupo alquilsulfonilo, el grupo arilsulfonilo, el átomo de halógeno y el grupo amino sustituido representado por R⁷ a R¹⁰ en la fórmula general [1], respectivamente.

El grupo alquilo, el grupo alquinilo y el grupo arilo representados por R^{11b} en la fórmula general [50] incluyen los mismos que los mostrados como ejemplo para el grupo alquilo, el grupo alquinilo y el grupo arilo representado por

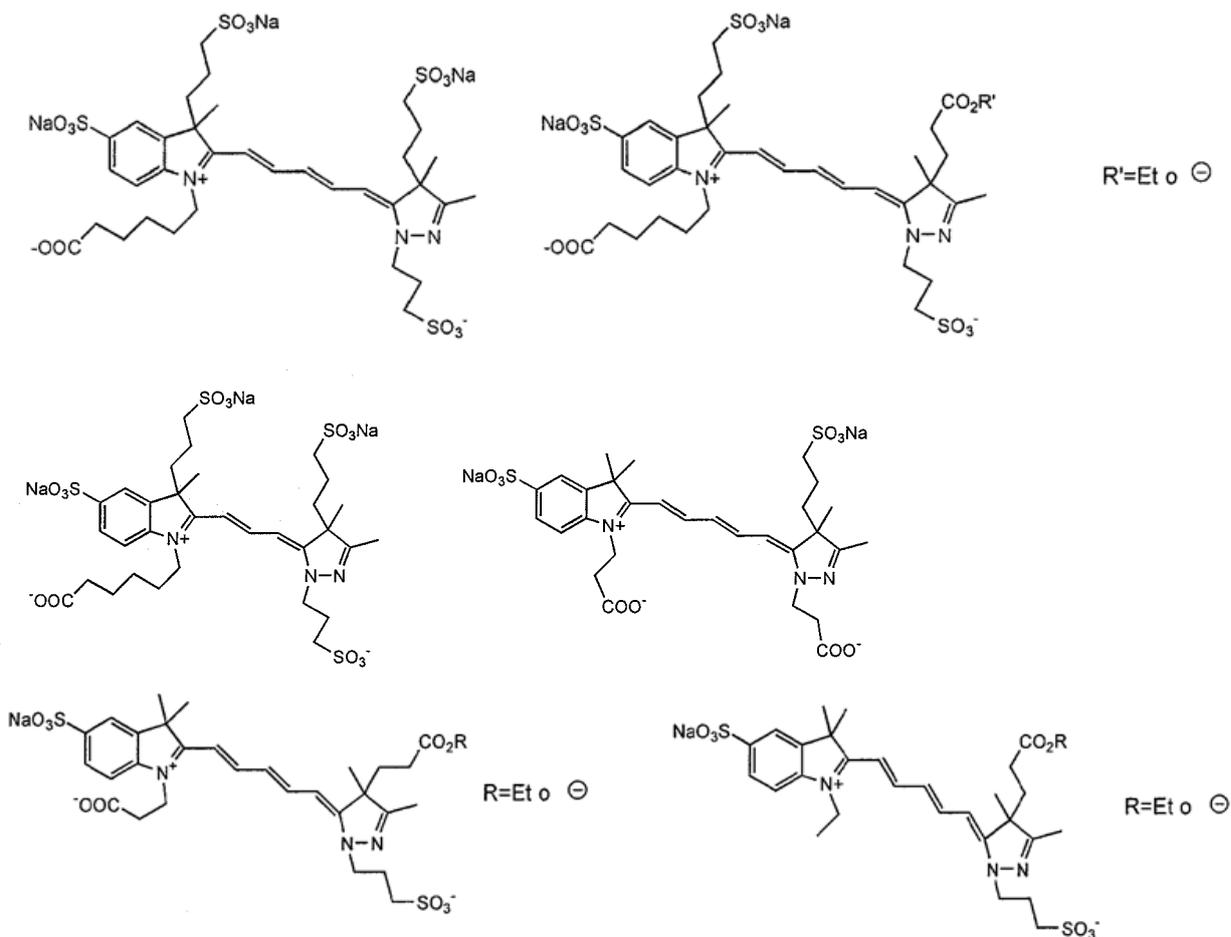
R¹¹ en la fórmula general [1], respectivamente.

Entre R^{11b}, se prefiere un grupo alquilo, en particular, por ejemplo, son más preferibles un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo n-hexilo, y similares.

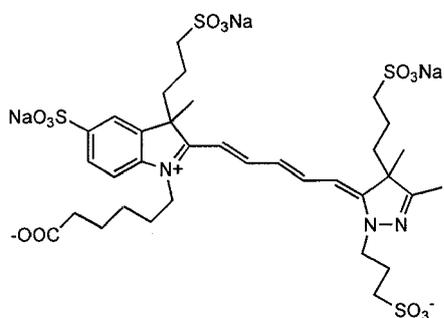
5 En la fórmula general [50], n' representa un número entero habitualmente de desde 0 hasta 3, preferiblemente 1 ó 2 y más preferiblemente 2.

Un ejemplo específico preferido de la fórmula general [50] incluye, por ejemplo, los siguientes compuestos:

10



15 y entre ellos, se prefiere el siguiente compuesto:



20 El compuesto representado por la fórmula general [50] que es el compuesto que contiene grupo anión relevante para la presente invención puede sintetizarse, por ejemplo, según el método común (documento WO 2007/114398).

El analito en el que puede usarse el compuesto de la presente invención como sustancia de patrón interno o

sustancia de marcado fluorescente no está particularmente limitado sino que incluye todas las sustancias de medición en este campo. Específicamente, el analito incluye, por ejemplo, cadena peptídica (por ejemplo, péptido C, angiotensina I, y similares), proteína [proteína sérica tal como, por ejemplo, inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), β 2-microglobulina, albúmina, producto de degradación de la misma, ferritina; proteínas enzimáticas tales como, por ejemplo, amilasa, fosfatasa alcalina, γ -glutamyltransferasa; cadenas de proteínas, péptidos o azúcar derivadas de bacterias tales como, por ejemplo, bacteria tuberculosa, neumococos, bacilo de difteria, meningococos, gonococos, estafilococos, estreptococos, bacterias intestinales, bacterias coliformes, *Helicobacter pylori*; virus tales como, por ejemplo, virus de la rubeola, virus del herpes, virus de la hepatitis, virus de ATL, virus del SIDA, virus de la gripe, adenovirus, enterovirus, poliovirus, virus de EB, VHA, VHB, VHC, VIH, VLTH; hongos tales como, por ejemplo, *Candida*, *Cryptococcus*; espiroquetas tales como *Leptospira*, *Treponema pallidum*; microorganismos tales como *Chlamydia*, *Mycoplasma*; diversos tipos de alérgenos que provocan alergia tales como asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis atópica tales como alérgenos derivados, por ejemplo, de polvo doméstico; ácaros tales como, por ejemplo, *Dermatophagoides* y *Farina*, *Dermatophagoides pteronyssinus*; polen, por ejemplo, de cedro japonés, ciprés japonés, *Paspalum thunbergii Kunth*, ambrosías, hierba timotea, alestas, centeno; animales tales como, por ejemplo, gato, perro, cangrejo; alimentos tales como, por ejemplo, arroz, clara de huevo; hongos, insectos, madera, agentes médicos, sustancias químicas, y similares; lípidos tales como, por ejemplo, lipoproteínas; proteasas tales como, por ejemplo, tripsina, plasmina, serina proteasa; proteínas marcadoras tumorales tal como, por ejemplo, AFP, PSA, CEA, PG I, PG II; y similares], cadena de azúcar (cadenas de azúcar antigénicas de cadenas de azúcar de marcadores tumorales tales como, por ejemplo, CA 19-9, PIVKA-II, CA 125, cadenas de azúcar presentes en una sustancia que tiene una cadena de azúcar particular producida por células cancerosas; por ejemplo, cadenas de azúcar ABO, y similares), lectina (por ejemplo, concanavalina A, lectina de lentejas, lectina de judías blancas, lectina de trompetas de ángel, lectina de germen de trigo, y similares), fosfolípido (por ejemplo, cardiolipina, y similares), lipopolisacárido (por ejemplo, endotoxinas, y similares), sustancia química (hormonas tales como, por ejemplo, PTH, T3, T4, TSH, insulina, LH, FSH, prolactina; alteradores endocrinos tales como, por ejemplo, tributiltina, nonilfenol, 4-octilfenol, ftalato de di-n-butilo, ftalato de dicitclohexilo, benzofenona, octacloroestireno, ftalato de di-2-etilhexilo), receptor (por ejemplo, receptores de estrógenos, TSH, y similares), ligando (por ejemplo, estrógenos, TSH, y similares), y entre ellos, se prefieren proteína marcadora tumoral tal como, por ejemplo, AFP, PSA, CEA, PG I, PG II, y cadena de azúcar antigénica de cadena de azúcar de marcador tumoral tal como, por ejemplo, CA 19-9, PIVKA-II, CA 125, cadena de azúcar presentes en una sustancia que tiene una cadena de azúcar particular producida por células cancerosas, y se prefieren particularmente AFP y PIVKA-II.

Método de electroforesis en el método de medición usando el compuesto de la presente invención como sustancia de patrón interno o sustancia de marcado fluorescente incluye todos los métodos usados habitualmente en este campo, y entre ellos, se prefiere un método de electroforesis llevado a cabo en un capilar (método de electroforesis capilar). Entre dichos métodos de electroforesis capilares, se prefiere un método de electroforesis llevado a cabo en un chip capilar. El método de electroforesis de (micro)chip capilar es una tecnología en la que se forma un capilar que tiene una sección transversal de 100 μ m o menos de diámetro sobre un sustrato de un chip y se lleva a cabo la electroforesis en este capilar, y un método mediante el cual se separan sustancias presentes en una muestra utilizando una diferencia de carga como diferencia de movilidad aplicando voltaje eléctrico al interior del capilar.

El método de electroforesis capilar puede clasificarse en método de electroforesis de zona capilar y método de electroforesis en gel capilar dependiendo de la disolución de migración que va a usarse, y el método de la presente invención puede aplicarse a ambos. Entre los métodos anteriores, se prefiere el método de electroforesis en gel capilar en vista de su precisión de separación.

El material del capilar que va a usarse para el método de electroforesis capilar descrito anteriormente no está particularmente limitado, y puede usarse cualquier material usado comúnmente en este campo. Específicamente, el material incluye, por ejemplo, compuestos a base de sílice tales como, por ejemplo, vidrio, cuarzo, silicio; polímeros sintéticos tales como, por ejemplo, copolímeros de olefina cíclicos (COC), polímeros de olefina cíclicos (COP), poli(metacrilato de metilo), poli(metilsiloxano), poli(cloruro de vinilo), poliuretano, poliestireno, polisulfona, policarbonato, politetrafluoroetileno; y similares, y entre ellos, se prefieren polímeros sintéticos. Además, la longitud y el diámetro interno del capilar so están particularmente limitados siempre que pueda separarse el analito, pero un diámetro interno es habitualmente de 1 a 1000 μ m, preferiblemente de 1 a 200 μ m y más preferiblemente de 1 a 100 μ m. La longitud es habitualmente de 0,1 mm a 100 cm, preferiblemente de 0,1 mm a 20 cm y más preferiblemente de 0,1 mm a 10 cm.

La disolución de migración que va a usarse en el método de electroforesis relevante para la presente invención no está particularmente limitada, y puede usarse cualquier disolución usada comúnmente en este campo. En el caso del método de electroforesis de zona capilar, específicamente la disolución de migración incluye, por ejemplo, una disolución tampón de pH 5 a 10, preferiblemente pH 6 a 8, y la disolución tampón puede incluir específicamente, pero sin limitarse a, por ejemplo, un tampón lactato, un tampón citrato, un tampón acetato, un tampón succinato, una disolución tampón glicina, un tampón ftalato, un tampón fosfato, un tampón trietanolamina, un tampón borato, un tampón glicina, un tampón barbiturato, una disolución tampón clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano, una disolución tampón tartrato, una disolución tampón borato, y similares. Además, en el caso del método de

electroforesis en gel capilar, la disolución de migración incluye una en la que se añade un polímero, por ejemplo, poliéter tal como, por ejemplo, poli(óxido de etileno) (polietilenglicol), poli(óxido de propileno); polialquilenimina tal como, por ejemplo, polietilenimina; polímero a base de poli(ácido acrílico) tal como, por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éster de acrilato), poli(metacrilato de metilo); polímero a base de poliamida tal como, por ejemplo, poliacrilamida, polimetacrilamida; polímero a base de poli(ácido metacrílico) tal como, por ejemplo, poli(ácido metacrílico), poli(éster de metacrilato), poli(metacrilato de metilo); polímero a base de polivinilo tal como, por ejemplo, poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, poliviniloxazolidona; polímero de hidroxilo soluble en agua tal como, por ejemplo, pulunano, goma de elusina, goma xantano, dextrano, goma guar; compuestos de celulosa solubles en agua tales como, por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, y similares; derivados de los mismos; copolímeros que contienen tipos plurales de unidades de monómeros que constituyen estos polímeros; y similares a las disoluciones tampón que van a usarse como disolución de migración para la electroforesis de zona capilar descrita anteriormente. Debe observarse que los polímeros descritos anteriormente pueden añadirse en una combinación de dos o más tipos. Además, el peso molecular de los polímeros descritos anteriormente tal como se mencionan anteriormente es habitualmente de 500 Da a 6000 kDa, preferiblemente de 1 a 1000 kDa y más preferiblemente de 100 a 100 kDa. Además, la concentración de los polímeros descritos anteriormente puede seleccionarse apropiadamente a partir de un intervalo usado habitualmente en este campo, y habitualmente es del 0,01 al 40% (P/V), preferiblemente del 0,01 al 20% (P/V) y más preferiblemente del 0,1 al 10% (P/V). Debe observarse que la viscosidad de la disolución tampón para migración cuando se añade la carga descrita anteriormente a la disolución tampón para migración habitualmente es de 2 a 1000 centipoise, preferiblemente de 5 a 200 centipoise y más preferiblemente de 10 a 100 centipoise.

La disolución de migración descrita anteriormente puede contener una sustancia para reducir un efecto de flujo electroosmótico tal como, por ejemplo, poliacrilamida, polietilenglicol, polietilenimina, hidrocarburo aromático que contiene flúor, azúcares, y similares, y puede ajustarse la concentración de la misma en un intervalo que se usa habitualmente en este campo.

Puesto que el voltaje en la migración en el método de electroforesis relevante para la presente invención varía dependiendo de la disolución de migración, el equipo que va a usarse, o similares, el voltaje puede ajustarse de manera apropiada en un intervalo que se usa habitualmente en este campo.

El método para introducir una muestra, compuesto [1] de una sustancia de patrón interno de la presente invención o el compuesto que contiene grupo anión relevante para la presente invención, en el método de electroforesis relevante para la presente invención, no está particularmente limitado, y puede ser un método usado habitualmente en este campo. El método incluye, por ejemplo, método de aspiración, método de presurización, método de introducción eléctrica, y similares. Entre ellos, se prefiere el método de presurización. Debe observarse que la sustancia de patrón interno relevante para la presente invención puede introducirse mediante o bien un método en el que la sustancia de patrón interno se disuelve en una muestra anteriormente o bien un método en el que una muestra y una disolución que contienen la sustancia de patrón interno se introducen por separado. La cantidad que va a introducirse de la sustancia de patrón interno varía dependiendo de condiciones tales como longitud y diámetro interno del capilar, tipo y sensibilidad de detector, o similares, pero habitualmente se usa la misma cantidad que el volumen de inyección de muestra. Debe observarse que la introducción de la muestra descrita anteriormente o la sustancia de patrón interno relevante para la presente invención puede llevarse a cabo concentrando mediante una isotacoforesis (ITP) conocida y tras esto introduciendo el concentrado a la electroforesis capilar tal cual. En este caso, por ejemplo, cuando se usa electroforesis de microchip, es deseable llevar a cabo la electroforesis de ITP y la electroforesis capilar usando de manera continua un chip en el que la electroforesis de ITP y la electroforesis capilar están conectadas entre sí.

La muestra descrita anteriormente no está particularmente limitada, y la muestra puede ser una disolución que contiene el analito descrito anteriormente. Específicamente, la muestra incluye, por ejemplo, fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido linfático; excrementos tales como orina y heces; muestras derivadas de organismos vivos tales como esputo, pus, sustancias derivadas de la piel; muestras ambientales tales como, por ejemplo, alimentos, bebidas, agua corriente, agua marina, agua de lagos, agua de ríos, efluentes industriales, agua de lavado de semiconductores, agua de limpieza tras la limpieza de dispositivos médicos, y similares; y líquidos procesados obtenidos reconstituyendo mediante disolución apropiada de estas sustancias en agua, una disolución tampón que va a usarse habitualmente en este campo tal como, por ejemplo, un tampón Tris, un tampón fosfato, un tampón Veronal, un tampón borato, un tampón de Good; y similares.

El método de electroforesis relevante para la presente invención se lleva a cabo específicamente, por ejemplo, llenando un capilar que tiene un diámetro interno de 50 a 100 μm y una longitud de 1 a 10 cm con tampón Tris-HCl que contiene, por ejemplo, del 0,1 al 1,0% de poli(metacrilato de dimetilaminoetilo), del 1 al 5% de glicerol y del 0,01 al 0,1% de BSA, introduciendo una muestra que contiene un tipo de sustancia de patrón interno mediante un método de presurización a de 1 a 10 psi durante de 30 a 60 segundos en el capilar, introduciendo entonces otras sustancias de patrón interno en el capilar mediante un método de presurización a de 1 a 10 psi durante de 30 a 60 segundos, sometiéndola posteriormente a electroforesis aplicando un voltaje de, por ejemplo, de 1000 a 3000 V durante de 10 a 60 minutos, y midiendo mediante un detector tal como detector de fluorescencia y detector UV.

El método de medición relevante para la presente invención se realiza llevando a cabo la electroforesis en condiciones tal como se mencionó anteriormente, y midiendo estados de migración de un analito y las sustancias de patrón interno usando un detector tal como detector de fluorescencia, detector UV, y similares para obtener un electroferograma, identificando picos de las sustancias de patrón interno en dicho electroferograma, tras esto identificando un pico de analito a partir de un tiempo de migración del mismo, y similares.

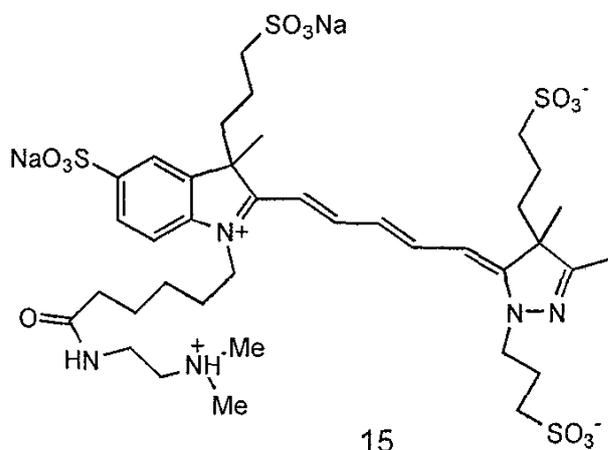
Más específicamente, por ejemplo, cuando se mide un analito en una muestra usando dos sustancias de patrón interno, anteriormente se lleva a cabo la electroforesis para las sustancias de patrón interno y una sustancia patrón del analito, y se miden los tiempos de migración de dos sustancias de patrón interno y el analito, razón de los tiempos de migración entre las respectivas muestras de patrón interno, y las razones de los tiempos de migración entre las sustancias de patrón interno y el analito. Posteriormente, se lleva a cabo la electroforesis de la muestra y el analito en las mismas condiciones y se identifican picos de dos sustancias de patrón interno a partir de sus tiempos de migración y las razones de migración entre las respectivas sustancias de patrón interno obtenidas anteriormente. Finalmente, se identifica el pico del analito a partir de los tiempos de migración de dichas dos sustancias de patrón interno y las razones de los tiempos de migración entre la respectivas sustancias de patrón interno y el analito obtenidos anteriormente.

Además, el compuesto de la presente invención puede usarse como sustancia de marcado. En este caso, un grupo de activación de reacción que puede unirse a una sustancia que va a marcarse puede introducirse en el compuesto de la presente invención, y dicho grupo de activación de la reacción, el método de introducción del mismo, y similares incluyen los métodos usados habitualmente en este campo.

A continuación en el presente documento, se explicará la presente invención aún más específicamente usando ejemplos y ejemplos comparativos, pero la presente invención no se limita a estos de ninguna manera.

Ejemplos

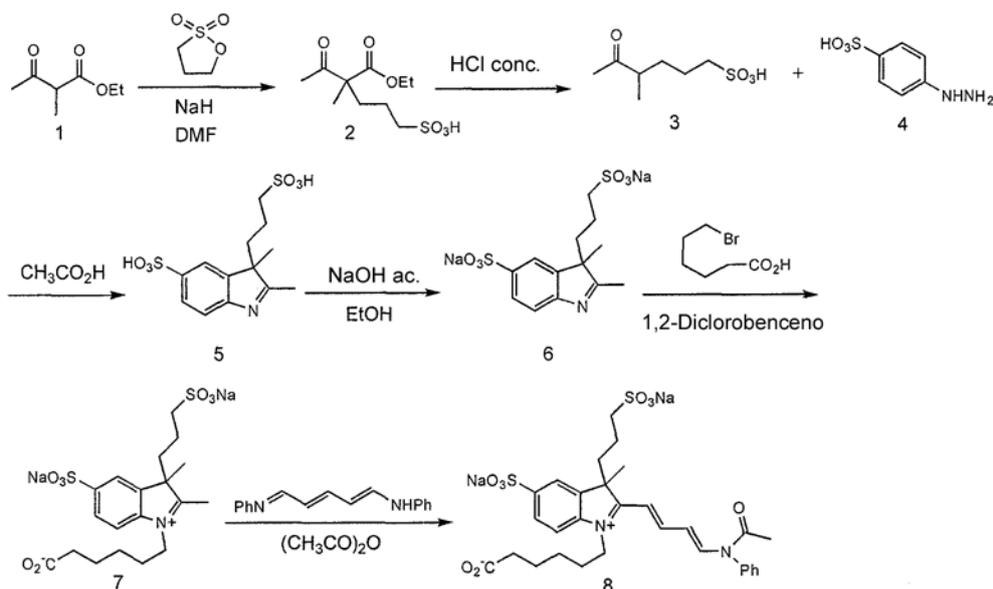
Ejemplo 1. Síntesis de compuesto de la presente invención (15)



* Me = grupo metilo

30

(1) Síntesis de compuesto de indolenina (8)



*Et = grupo etilo, Ph = grupo fenilo

[Síntesis del compuesto (2)]

- 5 Se añadieron 2-metilacetoacetato de etilo (1) (25,0 g, 0,173 mol), 1,3-propanosulfona (23,3 g, 0,190 mol) e hidruro de sodio (8,5 g, 0,208 mol) a N,N-dimetilformamida (DMF) (80 ml) y se hizo reaccionar la disolución con agitación a 90°C durante la noche. Tras completarse la reacción, se retiró por destilación el disolvente a presión reducida, y se lavó la mezcla residual dos veces añadiendo agua (200 ml) y dietil éter (200 ml). Tras esto, se retiró por destilación la parte de fase acuosa a presión reducida para obtener el compuesto (2) (42,1 g, rendimiento: 91%).

10

[Síntesis del compuesto (3)]

- 15 Se hizo reaccionar el compuesto (2) (40,5 g, 0,152 mol) en ácido clorhídrico concentrado (60 ml) con agitación a 100°C durante 3 horas. Tras completarse la reacción, se retiró por destilación el disolvente a presión reducida y se purificó el producto usando cromatografía en columna de gel de sílice (eluato: metanol) para obtener el compuesto (3) (16,6 g, rendimiento: 56%).

15

[Síntesis del compuesto (5)]

- 20 Se calentaron el compuesto (3) (10,0 g, 0,051 mol) y el compuesto (4) (12,9 g, 0,066 mol) en ácido acético (50 ml) a reflujo a 120°C durante 4 horas. Tras completarse la reacción, se retiró por destilación el disolvente a presión reducida y se purificó el producto usando cromatografía en columna de fase inversa (eluato: agua) para obtener el compuesto (5) (11,5 g, rendimiento: 65%).

20

- 25 Datos de propiedades físicas: IR (KBr) (cm⁻¹): 3450, 1196.

[Síntesis del compuesto (6)]

- 30 Se disolvió el compuesto (5) (11,5 g, 0,033 mol) en agua (50 ml) y etanol (50 ml), y se hizo reaccionar la disolución con agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Tras completarse la reacción, se retiraron por destilación los disolventes a presión reducida y se purificó el producto usando cromatografía en columna de fase inversa (eluato: agua) para obtener el compuesto (6) (10,3 g, rendimiento: 80%).

30

Datos de propiedades físicas: Masa (nega = 346)

35

IR (KBr) (cm⁻¹): 3444, 1193.

[Síntesis del compuesto (7)]

- 40 Se disolvieron el compuesto (6) (10,0 g, 0,026 mol) y ácido 6-bromohexanoico (9,97 g, 0,052 mol) en 1,2-diclorobenceno (100 ml) y se hizo reaccionar la disolución con agitación a 120°C durante la noche. Tras completarse la reacción, se retiró por destilación el disolvente a presión reducida, y se lavó la mezcla residual con acetato de etilo

40

3 veces para obtener el compuesto (7) (11,5 g, rendimiento: 89%).

Datos de propiedades físicas: Masa (nega = 460)

5 IR (KBr) (cm⁻¹): 3446,1723, 1194.

[Síntesis del compuesto (8)]

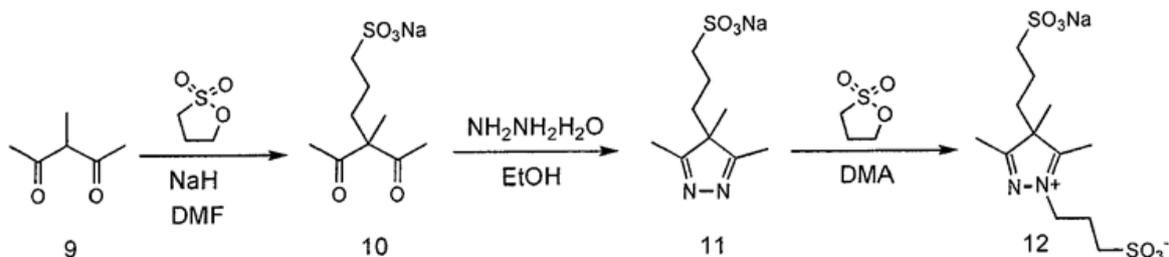
10 Se disolvieron el compuesto (7) (1,5 g, 2,967 mmol) y clorhidrato de malonaldehidodianilida (0,77 g, 2,967 mmol) en anhídrido acético (20 ml), y se hizo reaccionar la disolución con agitación a 120°C durante 1 hora. Tras completarse la reacción, se retiró por destilación el disolvente a presión reducida y se purificó el producto usando cromatografía en columna de fase inversa (eluato: disolución de acetonitrilo al 10%/agua) para obtener el compuesto de indolenina (8) (0,18 g, rendimiento: 10%).

15 Datos de propiedades físicas: Masa (nega = 631:633)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3443,1716, 1574, 1465, 1189.

(2) Síntesis del compuesto de pirazol (12)

20



*DMA = dimetilacetamida

[Síntesis del compuesto (10)]

25 Se hizo reaccionar una disolución de 3-metil-2,4-pentandiona (compuesto (9)) (15,0 g, 0,13 mol), 1,3-propanosulfona (16,1 g, 0,13 mol) e hidruro de sodio (5,0 g, 0,208 mol) en DMF (100 ml) con agitación a 50°C durante 16 horas. Tras completarse la reacción, se neutralizó la disolución con hidróxido de sodio 1 N y se retiró por destilación el disolvente a presión reducida y se lavó la mezcla residual dos veces añadiendo agua (200 ml) y dietil éter (200 ml). Tras esto, se retiró por destilación la parte de fase acuosa a presión reducida para obtener el compuesto de pirazol (10) (32,2 g, rendimiento: 96%).

30

Datos de propiedades físicas: IR (KBr) (cm⁻¹): 3474, 1695, 1665, 1191.

[Síntesis del compuesto (11)]

35

Se disolvieron el compuesto (10) (10,0 g, 0,042 mol) y monohidrato de hidrazina (2,1 g, 0,042 mol) en etanol (150 ml) y se hizo reaccionar la disolución con agitación a 80°C durante 3 horas. Tras completarse la reacción, se retiró por destilación el disolvente a presión reducida y se purificó el producto usando cromatografía en columna de gel de sílice (eluato: metanol/clorofórmico = 1/1) para obtener el compuesto (11) (9,0 g, rendimiento: 92%).

40

Datos de propiedades físicas: IR (KBr) (cm⁻¹): 3421, 1195.

[Síntesis del compuesto (12)]

45

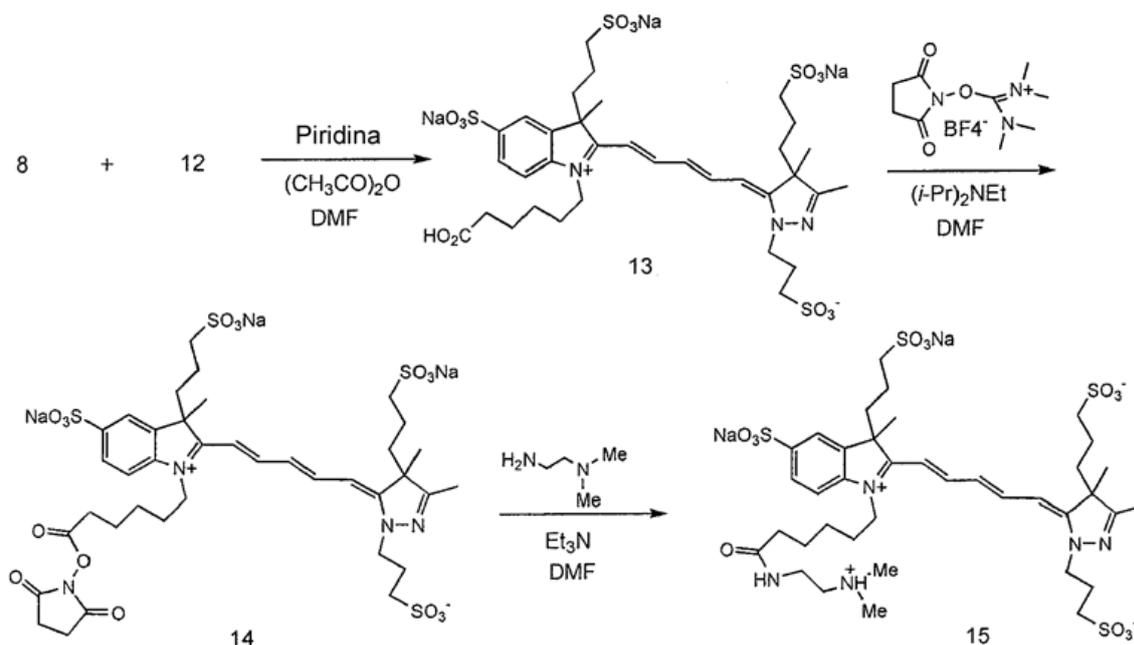
Se disolvieron el compuesto (11) (4,8 g, 0,019 mol) y 1,3-propanosulfona (2,5 g, 0,02 mol) en dimetilacetamida (30 ml), y se agitó la disolución a 140°C durante 4 horas. Tras completarse la reacción, se añadió acetato de etilo (200 ml), y se filtró el cristal precipitado para obtener el compuesto de pirazol (12) (5,3 g, rendimiento: 76%).

50

Datos de propiedades físicas: Masa (nega = 352)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3446, 1194.

(3) Síntesis de complejos de compuesto de indolenina - compuesto de pirazol (13) a (15)



[Síntesis del compuesto (13)] (compuesto conocido)

5 Se disolvieron el compuesto de indolenina (8) (0,1 g, 0,158 mmol) obtenido en el ejemplo 1 - (1) y el compuesto de pirazol (12) (0,17 g, 0,474 mmol) obtenido en el ejemplo 1 - (2) en DMF (2 ml), y se añadieron adicionalmente a los mismos piridina (1 ml) y anhídrido acético (0,5 ml). Se agitó la disolución a 80°C durante 1 hora. Tras completarse la reacción, se retiró por destilación el disolvente a presión reducida y se purificó el producto usando cromatografía en columna de fase inversa (eluato: disolución acuosa de metanol al 10%) y Sephadex LH-20 [producida por GE Healthcare Bioscience Co., Ltd. (nombre anterior: Amersham Bioscience Co. Ltd.)] (eluato: metanol) para obtener el compuesto (13) (15 mg, rendimiento: 12%).

15 Datos de propiedades físicas: Masa (nega = 850).

A continuación se muestran las características de fluorescencia del compuesto (13).

Longitud de onda de absorción máxima ($\lambda_{\text{máx}}$)	634 nm
Coefficiente de absorción molar (ϵ)	$230.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Longitud de onda de excitación máxima [Ex(máx)]	635 nm
Longitud de onda de fluorescencia máxima [Em(máx)]	655 nm

20 [Síntesis del compuesto (14)]

25 Se disolvió el compuesto (13) (13 mg, 0,015 mmol) en DMF (0,6 ml) y se añadieron al mismo tetrafluoroborato de 2-succinimida-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU) (46 mg) y N-etildiisopropilamina [($i\text{-Pr}$) $_2\text{NEt}$] (600 μl). Se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras completarse la reacción, se precipitó el producto añadiendo acetato de etilo (15 ml) y se centrifugó para obtener el compuesto (14) (13 mg, rendimiento: 90%).

25 Datos de propiedades físicas: Masa (nega = 947).

[Síntesis del compuesto (15)] (compuesto de la presente invención)

30 Se disolvió el compuesto (14) (7 mg) en DMF (0,5 ml) y se añadieron al mismo N,N-dimetilaminoetilamina (10 mg) y trietilamina (Et_3N) (2 μl). Se agitó la disolución durante 3 horas. Tras completarse la reacción, se retiró por destilación el disolvente a presión reducida y se purificó el producto usando columna de fase inversa preparativa para obtener el compuesto (15) (3,2 mg).

35 Datos de propiedades físicas: Masa (nega = 933).

A continuación se muestran las características de fluorescencia del compuesto (15).

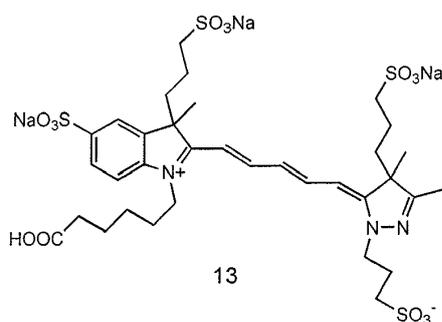
Longitud de onda de absorción máxima ($\lambda_{\text{máx}}$)	634 nm
Coefficiente de absorción molar (ϵ)	230.000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Longitud de onda de excitación máxima [Ex(máx)]	635 nm
Longitud de onda de fluorescencia máxima [Em(máx)]	655 nm

Ejemplo 2. Medición de la intensidad de fluorescencia del compuesto de la presente invención

5 Se estimaron de manera aproximada las intensidades de fluorescencia relativa del compuesto (13) conocido y del compuesto (15) de la presente invención.

10 En primer lugar, a partir de la intensidad de fluorescencia del compuesto (13) conocido, se midió la intensidad de fluorescencia por 1 μl del mismo, y entonces se estimó de manera aproximada la intensidad de fluorescencia relativa del compuesto de la presente invención, y la intensidad de fluorescencia del compuesto conocido es de 100.

15 Se disolvió el compuesto (13) conocido en agua purificada (1 ml). Se diluyó esta disolución 200 veces con tampón fosfato 50 mM (pH 7,5) y se midió el valor de DO. Posteriormente, se disolvió el compuesto (15) de la presente invención obtenido en el ejemplo 1 - (1) en agua purificada (1 ml), y se diluyó esta disolución con tampón fosfato 50 mM (pH 7,5) de manera que el valor de DO del mismo se volvió equivalente al del compuesto (13) conocido. En este momento, se estimó de manera aproximada la intensidad de fluorescencia relativa del siguiente compuesto (15) de la presente invención, con la condición de que la intensidad de fluorescencia por 1 unidad de valor de DO de compuesto (13) conocido sea 100. Los resultados se muestran en la tabla 2.



20 [Tabla 2]

Compuesto (colorante fluorescente)		Intensidad de fluorescencia relativa [intensidad de fluorescencia del compuesto (13) conocido = 100]
Ejemplo 1	Compuesto (15) de la presente invención	100
Ejemplo comparativo 1	Compuesto conocido (13)	100

25 Tal como resulta obvio a partir de los resultados de la tabla 2, se encontró que el compuesto (15) de la presente invención mostró la misma intensidad de fluorescencia que el compuesto (13) conocido.

Ejemplo experimental 1. Separación y medición de AFP

30 La separación y la medición de AFP se llevaron a cabo usando el compuesto de la presente invención como sustancia de patrón interno en una electroforesis.

[Analito (antígeno)]

35 α -fetoproteína (AFP) (producida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

[Sustancia de unión de cambio de la movilidad (anticuerpo marcado con ADN)]

Según el procedimiento mostrado en la figura 1, se preparó un fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP unido a ADN.

40 Es decir, en primer lugar, se purificó un fragmento de ADN de 250 pb al que se le había introducido un grupo NH₂ en el extremo 5' terminal mediante un método común (ADN aminado en el extremo terminal, purificado), posteriormente se hizo reaccionar el grupo NH₂ introducido en este fragmento de ADN con un grupo succinimida del ligador 4-(p-maleimidofenil)butilato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMPB) (un ligador que tiene un grupo succinimida y un grupo

maleimida, producido por Pierce Biotechnology, Inc.) mediante un método común y entonces se eliminó el ligador que no había reaccionado sometándolo a tratamiento de filtración en gel, para obtener un fragmento de ADN de 250 pb unido a un ligador. Se hizo reaccionar el fragmento de ADN de 250 pb unido a ligador obtenido con fragmento Fab' de anticuerpo WA1 anti-AFP preparado anteriormente usando anticuerpo WA1 anti-AFP (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) según un método común. Se purificó el producto obtenido usando una columna DEAE, respectivamente, para preparar un fragmento Fab' de anticuerpo WA1 anti-AFP al que se había unido un fragmento de ADN de 250 pb (anticuerpo marcado con ADN de 250 pb).

[Sustancia de unión marcada (anticuerpo marcado por fluorescencia)]

Se trató anticuerpo WA2 anti-AFP (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que reconoció diferentes epítomos de AFP de WA1 mediante un método común para preparar un fragmento Fab' de anticuerpo WA2 anti-AFP, y entonces se introdujo una sustancia fluorescente HyLyte 647 (producida por AnaSpec, Inc.) en un grupo amino de dicho fragmento mediante un método común, para preparar un fragmento Fab' de anticuerpo WA 2 anti-AFP marcado con HyLyte 647 (anticuerpo marcado por fluorescencia).

[Sustancia de patrón interno]

Como sustancia de patrón interno 1, se usó el compuesto (13) conocido (como producto intermedio del compuesto de la presente invención) obtenido en el ejemplo 1.

Como sustancia de patrón interno 2, se usó el compuesto (15) de la presente invención obtenido en el ejemplo 1.

[Chip capilar]

Se preparó un chip capilar que tenía a una distribución mostrada en la figura 2 tal como se describe a continuación según el método descrito en "Technology and applications of micro chemical chip, Takehiko Kitamori, *et al.*, 2004 (Maruzen Co., Ltd.)".

Es decir, se preparó una película fotorresistente sobre Si depositado sobre un sustrato de cuarzo. Se expuso esta película fotorresistente usando una máscara que tiene el diseño capilar (distribución) ilustrado en la figura 2, y entonces se llevó a cabo el revelado. Se eliminó por pulverización Si en el área en la que se eliminó la película fotorresistente mediante el revelado, tras esto, se llevó a cabo grabado en húmedo usando una disolución de fluoruro de hidrógeno para preparar un surco de canal capilar (capilar) sobre el sustrato de cuarzo. Tras eliminar la película fotorresistente y las películas de Si que quedaban sobre el sustrato de cuarzo, se laminaron dicho sustrato de cuarzo y una palca de cobertura que tenía orificios (pocillos) como depósitos de líquido mediante el método de conexión de HF para preparar un chip capilar.

Debe observarse que, en la figura 2, TB representa un pocillo para introducir tampón de arrastre, LB 1 y LB2 representan pocillos para introducir tampón de conducción, S representa un pocillo para introducir muestra para migración, R1 representa un pocillo para introducir disolución de prueba (disolución que contiene anticuerpo marcado con ADN de 250 pb), W1, W2 y W3 representan pocillos de drenaje, respectivamente.

[Electroforesis]

(1) Tampón de conducción

Se usó un tampón Tris-HCl 75 mM (pH 7,5) que contenía el 0,6% (p/v) de polidimetilacrilamida (pDMA), el 3% (p/v) de glicerol, 75 mM de NaCl, el 0,01% de albúmina sérica bovina (BSA) y 4 mg/ml de LCA como tampón de conducción.

(2) Tampón de arrastre

Se usó un tampón Tris 75 mM que contenía el 6% (p/v) de pDMA, el 3% (p/v) de glicerol, el 0,01% de BSA y 125 mM de HEPES como tampón de arrastre.

(3) Muestra para la migración

Se usó tampón Tris-HCl 75 mM (pH 7,5) que contenía el 0,6% (p/v) de polidimetilacrilamida (pDMA), el 3% (p/v) de glicerol, 75 mM de NaCl, el 0,01% de BSA y 3,6 mM de MES como tampón de muestra, y se mezclaron 1 μ l de suero que contenía 100 pM de AFP, 1 μ l de una mezcla de 1 μ M de anticuerpo marcado por fluorescencia y 1 nM de colorante fluorescente WAKO-635 y 8 μ l del tampón de muestra en un tubo de 0,5 ml, para preparar 10 μ l de líquido de reacción.

Se colocó el líquido de reacción en hielo para permitir que avanzara la reacción de antígeno-anticuerpo durante aproximadamente 30 minutos, para formar un complejo inmunitario de anticuerpo marcado por fluorescencia-AFP.

Debe observarse que la concentración final del anticuerpo marcado por fluorescencia era de 100 nM.

Se usó el líquido de reacción que contenía complejo inmunitario obtenido como muestra para migración.

5 (4) Disolución de prueba (disolución que contiene anticuerpo marcado con ADN de 250 pb)

Se usó un tampón de conducción que contenía 100 nM de anticuerpo marcado con ADN de 250 pb y 1 nM de colorante fluorescente WAKO-635-NH₂ (que contenía 50 mM de ion Cl⁻) como disolución de prueba.

10 (5) Procedimientos de electroforesis

a) Introducción de la muestra para migración y la disolución de prueba

15 En la figura 2, se añadieron gota a gota 10 µl de la muestra para migración (disolución que contenía complejo inmunitario de anticuerpo marcado por fluorescencia-AFP) al pocillo S (un pocillo para introducir una muestra para migración), 10 µl de la disolución de prueba (disolución que contenía anticuerpo marcado con ADN) al pocillo R1 (un pocillo para introducir una disolución de prueba), 10 µl del tampón de conducción al pocillo LB 1 y al pocillo LB2, y 10 µl del tampón de arrastre al pocillo TB, respectivamente. Se introdujeron la muestra para migración, la disolución de prueba, el tampón de conducción y el tampón de arrastre al interior de canales aplicando una presión de -5 psi
20 entre W1 (un pocillo para el drenaje) - W2 (un pocillo para el drenaje) - W3 (un pocillo para el drenaje) durante 30 segundos. La disposición de la muestra para migración y la disolución de prueba en un capilar se muestran esquemáticamente en la figura 3.

25 Debe observarse que, en la figura 3, el área sombreada representa una parte ocupada con la muestra para migración, y la parte punteada representa una parte ocupada con la disolución de prueba.

b) ITP (reacción, concentración, separación) · detección

30 Aplicando un voltaje de 3000 V entre el pocillo TB y el pocillo LB1 en la figura 3, se puso en contacto el anticuerpo marcado con ADN de 250 pb en la disolución de prueba con complejo inmunitario de anticuerpo marcado por fluorescencia - AFP en la muestra para migración a 30°C, para formar un complejo inmunitario de anticuerpo marcado por fluorescencia - AFP - anticuerpo marcado con ADN de 250 pb, que entonces se concentró mediante isotacoforesis (ITP).

35 Debe observarse que el tiempo de reacción era de aproximadamente 100 segundos (como tiempo para que el anticuerpo marcado con ADN de 250 pb pasara a través de la zona de la muestra para migración (la zona sombreada)). Después de someterse el complejo inmunitario a isotacoforesis en LB2 y juzgarse su paso a través de LB2 a partir de un cambio en el voltaje, se cambió el electrodo negativo de TB a LB2, y se llevó a cabo
40 adicionalmente electroforesis en gel capilar (CGE) hasta que se detectó un pico del complejo inmunitario de anticuerpo marcado por fluorescencia - AFP - anticuerpo marcado con ADN de 250 pb en la parte de detección (una parte capilar separada 2 cm de la parte de cruce del canal LB2).

45 Debe observarse además que la detección se llevó a cabo midiendo a lo largo del tiempo la intensidad de fluorescencia generada por excitación láser a 635 nm en la parte capilar separada 2 cm de la parte de cruce del canal LB2, mediante un microscopio de fluorescencia (BX-50, producido por KS Olympus Co., Ltd.).

[Resultados]

50 En la figura 4 se muestra un perfil electroforético (cromatograma electroforético) cuando se usó la muestra para migración. Debe observarse que, en la figura 4, el eje vertical representa la intensidad de fluorescencia y el eje horizontal representa el tiempo de retención, respectivamente.

55 A partir de los resultados en la figura 4, se encontró que llevando a cabo electroforesis usando sustancias de patrón interno 1 y 2 relevantes para la presente invención tal como se mencionó anteriormente, los picos de AFP-L1 y AFP-L3 del objeto de medición llegaron a aparecer entre ambos picos de las sustancias de patrón interno, y de ese modo ambos picos podían identificarse fácilmente.

Ejemplo 3. Separación y medición de PIVK II

60 [Analito (antígeno)]

Se preparó PIVK II según el método descrito en Poser JW, Price PA, J. Biol. Chem. 1979, 25 de enero; 254(2): 431-6.

65 [Sustancia de unión de cambio de movilidad (anticuerpo marcado con ADN)]

La preparación de la sustancia se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto porque se usó el fragmento Fab' de PIVKA II en lugar del fragmento Fab' de anticuerpo WA1 anti-AFP, para obtener un fragmento Fab' de anticuerpo anti-PIVKA II (anticuerpo marcado con ADN de 250 pb).

5 [Sustancia de unión marcada (anticuerpo marcado por fluorescencia)]

Se trató un anticuerpo anti-protrombina preparado mediante un método común para preparar un fragmento Fab' de anticuerpo anti-protrombina, e introduciendo una sustancia fluorescente HiLyte 647 (producida por AnaSpec, Inc.) mediante un método común a un grupo amino de dicho fragmento, se preparó el fragmento Fab' de anticuerpo anti-protrombina marcado con HiLyte 647 (anticuerpo marcado por fluorescencia).

[Sustancia de patrón interno]

15 Se usaron las mismas sustancias de patrón interno 1 y 2 que en el ejemplo 1.

[Chip capilar]

Se usó el mismo que en el ejemplo 1.

20 [Electroforesis]

(1) Tampón de conducción

Se usó el mismo que en el ejemplo 1.

25

(2) Tampón de arrastre

Se usó el mismo que en el ejemplo 1.

30 (3) Muestra para migración

Se usó un tampón Tris-HCl 75 mM (pH 7,5) que contenía el 0,6% (p/v) de polidimetilacrilamida (pDMA), el 3% (p/v) de glicerol, 75 mM de NaCl, el 0,01% de BSA y 3,6 mM de MES como tampón de muestra, y se mezclaron 1 µl de suero que contenía 100 pM de PIVKA II, 5 µl de una mezcla de 1 µM de anticuerpo marcado por fluorescencia y 1,4 nM de sustancia de patrón interno 1, y 8 µl del tampón de muestra en un tubo de 0,5 ml, para preparar un líquido de reacción.

35

Se colocó el líquido de reacción en hielo para permitir que avance una reacción de antígeno-anticuerpo durante aproximadamente 30 minutos, para formar un complejo inmunitario de anticuerpo marcado por fluorescencia - PIVKA II. Debe observarse que la concentración final del anticuerpo marcado por fluorescencia era de 100 nM.

40

Se usó el líquido de reacción que contenía el complejo inmunitario obtenido como muestra para migración.

(4) Disolución de prueba (disolución que contiene anticuerpo marcado con ADN de 250 pb)

45

Se usó un tampón de conducción que contenía 200 nM de anticuerpo marcado con ADN de 250 pb y 140 pM de sustancia de patrón interno 2 (que contenía 50 mM de ion Cl⁻) como disolución de prueba.

(5) Procedimientos de electroforesis

50

Se introdujeron la muestra para migración y la disolución de prueba de la misma manera que en el ejemplo 1, y tras concentrar mediante ITP y entonces llevar a cabo CGE, se midió la intensidad de fluorescencia generada mediante excitación láser a 635 nm en la parte capilar separada 2 cm de la parte de cruce del canal LB2 a lo largo del tiempo usando un microscopio de fluorescencia (BX-50, producido por Olympus Co., Ltd.).

55

[Resultados]

En la figura 5 se muestra un perfil electroforético (electroferograma) cuando se usó la muestra para migración. Debe observarse que en la figura 5, el eje vertical representa la intensidad de fluorescencia y el eje horizontal representa el tiempo de retención, respectivamente.

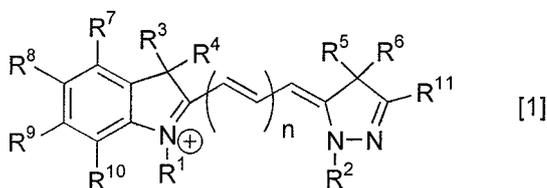
60

A partir de los resultados en la figura 5, se encontró que llevando a cabo la electroforesis usando sustancias de patrón interno 1 y 2 relevantes para la presente invención tal como se mencionó anteriormente, se permitió que un pico de PIVKA II se ubicase entre ambos picos de las sustancias de patrón interno, y de ese modo el pico de PIVKA II podía identificarse fácilmente.

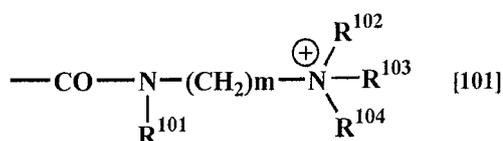
65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto representado por la fórmula general [1] o una sal del mismo:



[en la que R¹ a R⁶ representan cada uno independientemente un grupo alquilo de C₁ a C₁₀ o un grupo cicloalquilo de C₃ a C₁₀, que tienen ambos, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]:



(en la que R¹⁰¹ a R¹⁰⁴ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C₁ a C₃ y m representa un número entero de desde 2 hasta 6. Además, dos o tres de R¹⁰² a R¹⁰⁴ junto con un átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un catión de amonio heterocíclico); o

un grupo alquilo de C₁ a C₁₀ o un grupo cicloalquilo de C₃ a C₁₀, ambos de los cuales pueden tener de 1 a 10 enlaces amida en la cadena de alquilo de los mismos y pueden tener, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [2]:



(en la que R¹² representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C₁ a C₁₀, un grupo cicloalquilo de C₃ a C₁₀, un átomo de metal alcalino, un ión de amonio orgánico, un anión o ión de amonio); o

un grupo alquilo de C₁ a C₁₀ o un grupo cicloalquilo de C₃ a C₁₀, ambos de los cuales pueden tener de 1 a 10 enlaces amida en la cadena de alquilo de los mismos y pueden tener, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [3]:



(en la que R¹³ representa un átomo de hidrógeno, un átomo de metal alcalino, un ión de amonio orgánico, un anión o ión de amonio);

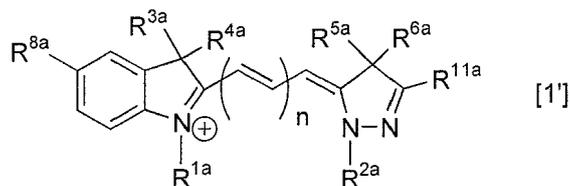
R⁷ a R¹⁰ representan cada uno independientemente un grupo alquilo de C₁ a C₆, un grupo cicloalquilo de C₃ a C₆, un grupo alquililo de C₂ a C₆, un grupo arilo de C₆ a C₁₀, un grupo alcoxilo de C₁ a C₆, un grupo ariloxilo de C₆ a C₁₀, un grupo alquilsulfonilo de C₁ a C₆, un grupo arilsulfonilo de C₆ a C₁₀, un grupo representado por la fórmula general [2], un grupo representado por la fórmula general [3], un átomo de halógeno, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo ciano, un grupo nitro o un grupo amino sustituido en el que 1 ó 2 átomos de hidrógeno están sustituidos por un grupo alquilo de C₁ a C₁₀, un grupo cicloalquilo de C₃ a C₁₀, un alcocarbonilo de C₁ a C₁₀, un grupo acilo de C₂ a C₂₀ o un grupo sulfo;

R¹¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de C₁ a C₁₀, un grupo cicloalquilo de C₃ a C₁₀, un grupo alquililo de C₂ a C₆ o un grupo arilo de C₆ a C₁₀, y

n representa un número entero de desde 0 hasta 3, y

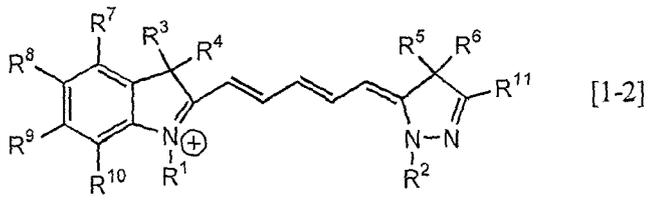
al menos uno de R¹ a R⁶ es un grupo alquilo de C₁ a C₁₀ o un grupo cicloalquilo de C₃ a C₁₀, ambos de los cuales tienen, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101].

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto representado por la fórmula general [1] es un compuesto representado por la siguiente fórmula general [1']:



(en la que R^{1a} a R^{6a} representan cada uno independientemente un grupo alquilo de C_1 a C_{10} o un grupo cicloalquilo de C_3 a C_{10} , ambos de los cuales tienen, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], o un grupo alquilo de C_1 a C_{10} o un grupo cicloalquilo de C_3 a C_{10} , ambos de los cuales pueden tener, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [2] o un grupo representado por la fórmula general [3], R^{8a} es un grupo representado por la fórmula general [3]; R^{11a} representa un grupo alquilo de C_1 a C_{10} , y n representa lo mismo que anteriormente, y al menos uno de R^{1a} a R^{6a} es un grupo alquilo de C_1 a C_{10} o un grupo cicloalquilo de C_3 a C_{10} , ambos de los cuales tienen, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]).

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^1 o R^2 es el grupo alquilo de C_1 a C_{10} o el grupo cicloalquilo de C_3 a C_{10} , ambos de los cuales tienen, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101].
4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto representado por la fórmula general [1] tiene de 1 a 4 grupos seleccionados del grupo representado por la fórmula general [3], el grupo alquilo de C_1 a C_{10} , que tiene, como sustituyente, el grupo representado por la fórmula general [3] y el grupo cicloalquilo de C_3 a C_{10} , que tiene, como sustituyente, el grupo representado por la fórmula general [3].
5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que el compuesto representado por la fórmula general [1] contiene 4 grupos seleccionados del grupo representado por la fórmula general [3], el grupo alquilo de C_1 a C_{10} que tiene, como sustituyente, el grupo representado por la fórmula general [3] y el grupo cicloalquilo de C_3 a C_{10} que tiene, como sustituyente, el grupo representado por la fórmula general [3].
6. Compuesto según la reivindicación 5, en el que R^8 es el grupo representado por la fórmula general [3] y uno cualquiera de R^1 o R^2 , uno cualquiera de R^3 o R^4 , y uno cualquiera de R^5 o R^6 son un grupo alquilo de C_1 a C_{10} o un grupo cicloalquilo de C_3 a C_{10} , ambos de los cuales tienen, como sustituyente, el grupo representado por la fórmula general [3].
7. Compuesto según la reivindicación 1, en el que uno cualquiera de R^1 o R^2 es el grupo alquilo de C_1 a C_6 o el grupo cicloalquilo de C_3 a C_6 , ambos de los cuales tienen, como sustituyente, el grupo representado por la fórmula general [101], y el otro es un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, el grupo representado por la fórmula general [3].
8. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^{101} es un átomo de hidrógeno, y uno cualquiera de R^{102} a R^{104} es un átomo de hidrógeno y otros dos son grupos alquilo de C_1 a C_3 , en la fórmula general [101].
9. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el grupo representado por la fórmula general [101] es un grupo N,N-dimetilamonioetilcarbamoilo.
10. Compuesto según la reivindicación 1, en el que uno cualquiera de R^3 y R^4 es un grupo alquilo de C_1 a C_5 o un grupo cicloalquilo de C_3 a C_5 , ambos de los cuales tienen, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [3], y el otro es un grupo alquilo de C_1 a C_6 o un grupo cicloalquilo de C_3 a C_6 ; uno cualquiera de R^5 y R^6 es un grupo alquilo de C_1 a C_5 o un grupo cicloalquilo de C_3 a C_5 , ambos de los cuales tienen, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [3], y el otro es un grupo alquilo de C_1 a C_6 o un grupo cicloalquilo de C_3 a C_6 .
11. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto representado por la fórmula general [1] es un compuesto representado por la siguiente fórmula general [1-2]:



(en la que las definiciones de R¹ a R¹¹ y los otros son iguales que anteriormente).

Fig.1

ADN aminado en el extremo terminal, purificado

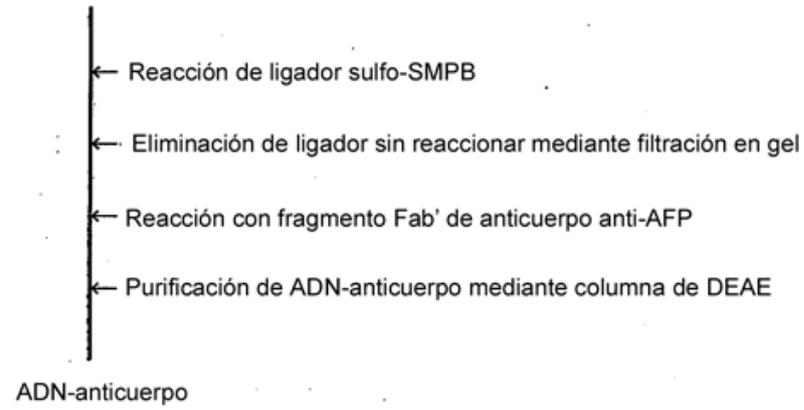


Fig.2

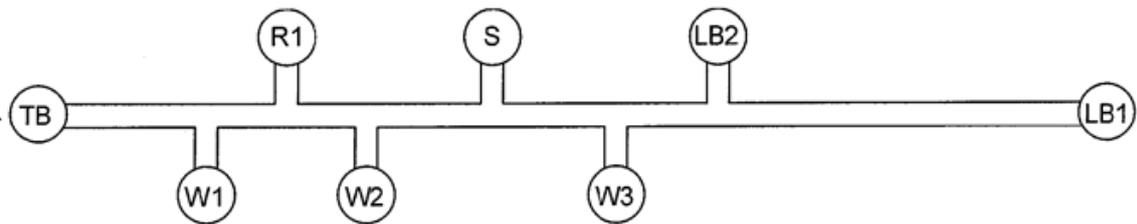


Fig.3

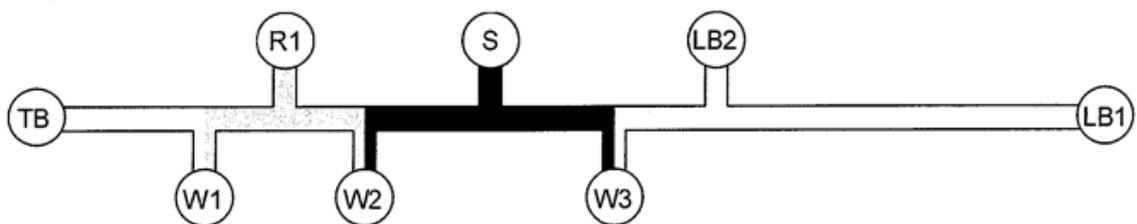


Fig.4

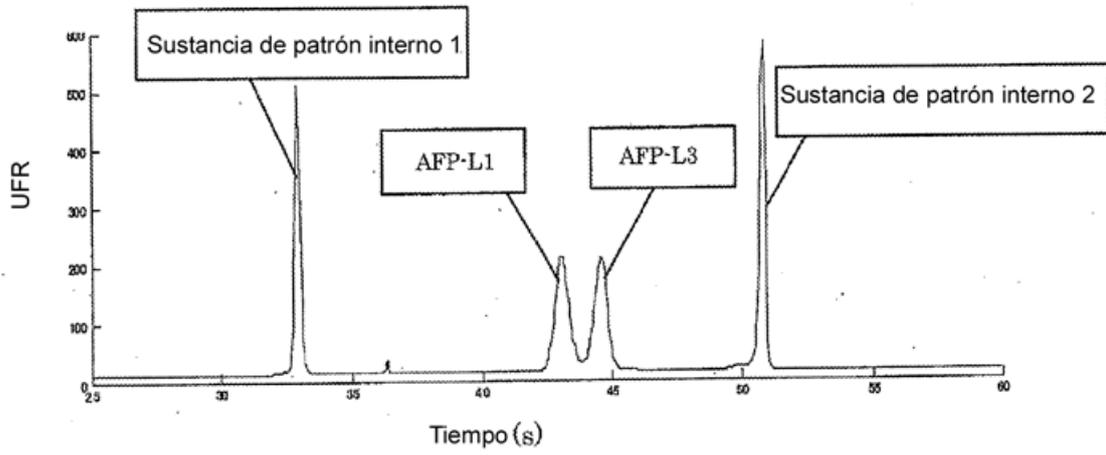


Fig.5

